

N° d'ORDRE : 18 / 2009 –M / SN

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE DES SCIENCES ET DE LA TECHNOLOGIE HOUARI BOUMEDIENE
FACULTE DES SCIENCES BIOLOGIQUES



THESE

Présentée pour l'obtention du Diplôme de MAGISTER
EN SCIENCE DE LA NATURE

ECOLE DOCTORALE : BIOTECHNOLOGIE ET SANTE

Par

FERIEL MEROUANE née LADJOUZI

THEME :

Application de la technologie des hybridomes pour la production d'anticorps monoclonaux anti-Bot III et Etude pharmacotoxicologique des venins scorpioniques et de leurs principales toxines radiomarqués

Soutenue publiquement le 16/12/2009, devant le jury composé de :

Professeur	C. TOUIL-BOUKOFFA	(FSB-USTHB)	Présidente
Professeur	F. LARABA-DJEBARI	(FSB-USTHB)	Directrice de thèse
Professeur	R. BAKOUR	(FSB-USTHB)	Examinateur
Docteur	D. HAMMOUDI-TRIKI	(FSB-USTHB)	Examinatrice
Docteur	A. BENZAID	(CRND)	Examinateur
Docteur	S. ADI-BESSALEM	(FSB-USTHB)	Examinatrice

RESUME

L'étude entreprise a consisté d'une part, à la production d'hybridomes sécréteurs d'anticorps monoclonaux dirigés contre la toxine III du venin de *Buthus occitanus tunetanus* (Bot), et d'autre part, à l'étude de la cinétique de distribution des venins de Bot et d'*Androctonus australis hector* (Aah), ainsi que de leurs principales neurotoxines Bot III et Aah II, après radiomarquage.

Les hybridomes producteurs d'anticorps spécifiques ont été obtenus, et les anticorps ont été caractérisés par RIA et ELISA simples lors du screening des surnageants. Quatre hybridomes ont été sélectionnés pour leurs stabilité, et production d'anticorps anti-Bot III ; caractéristique qui, cependant, diminuait au fur et à mesure des expansions. La régression progressive observée dans le pouvoir sécrétoire des hybridomes, lors des étapes d'expansion cellulaire est multifactorielle.

L'autre partie de ce travail, consacrée à l'aspect pharmacotoxicologique des toxines et venins de scorpions, a consisté, en premier lieu, à étudier les méthodes de radiomarquage à l'iode 125 et au technétium 99m, et de la stabilité de la liaison de l'isotope à son vecteur, puis à explorer, en second lieu, le comportement *in vivo* de ces peptides radiomarqués, par l'étude de la biodistribution par prélèvement d'organe ou par imagerie scintigraphique.

Les toxines Bot III et Aah II ont été marquées à l'iode 125, par substitution électrophile et oxydation à la chloramine-T. Le marquage au technétium des venins de Bot et d'Aah, a été réalisé par l'intermédiaire d'un kit bi fonctionnel, le Méthylène DiPhosphate (MDP) fabriqué *in situ*. Les radiotraceurs sont obtenus avec des rendements et activités spécifiques satisfaisants, sans perte de l'immunoréactivité vis-à-vis des anticorps spécifiques, observée sur 24 heures de conservation. Ces résultats sont compatibles pour l'étude de la bio distribution des peptides radiomarqués , administrés par les voies sous-cutanée et intraveineuse, sur deux modèles animaux (rat et souris).

Les résultats obtenus confirment bien la rapidité des cinétiques de distribution et d'élimination des venins scorpioniques, à partir du site d'injection vers les compartiments vasculaire et tissulaires, et ce quelque soit la voie d'injection, le modèle animal, ou le radioisotope utilisés.

L'étude comparative de la toxicocinétique des venins de Bot et d'Aah et de leurs principales toxines respectives Bot III et Aah II a révélé, des différences quant aux cibles majeures atteintes, et à la cinétique d'élimination.

En effet, contrairement à la fixation préférentielle du venin total au niveau du foie, du cœur, des poumons et des reins ; les neurotoxines seraient presque indétectables au niveau cardiaque et pulmonaire. De plus, elles seraient éliminées de l'organisme, de façon moins rapide et progressive, après une apparition gastrique et intestinale intense, expliquant ainsi les désagréments gastro-entériques observés chez l'envenimé. Ceci mènerait à conclure que les neurotoxines agissent indirectement sur ces organes via les canaux ioniques.

DEDICACES

A mes feux grands parents ;

A mes chers parents et beaux –parents ;

A mes chers sœurs, belle-sœur, frère, et beaux-frères ;

A mon très cher époux ;

A mes filles et ma nièce.

REMERCIEMENTS

Cette réflexion a été réalisée au Département des Applications Nucléaires du Centre de Recherche Nucléaire de Draria, sous la clairvoyante direction de Monsieur Benzaid A., et en collaboration avec le Laboratoire de Recherche et Développement sur les Venins de l'Institut Pasteur d'Algérie, sous la direction du Professeur Laraba-Djebari F.

Elle n'aurait pu être réalisée sans le soutien bienveillant, la disponibilité et les compétences de hauts cadres. Je tiens à exprimer mes remerciements à :

- ❖ Monsieur le Directeur Général du Centre de Recherche Nucléaire de Draria, Docteur Magnouche AEH., pour l'inestimable faveur qu'il m'a accordée, en acceptant ma propulsion dans le monde de la recherche scientifique, au sein de son établissement. Veuillez trouver ici Monsieur Magnouche AEH., l'expression de mon plus grand respect et de ma vive reconnaissance.
- ❖ Madame le Professeur Laraba-Djebari F., pour avoir accepté de diriger ce travail de thèse, mais avant tout pour son accueil toujours chaleureux au sein de son laboratoire et de son équipe, pour ses conseils, son soutien et sa grande disponibilité. Que ce travail soit un modeste témoignage de ma profonde déférence et reconnaissance.
- ❖ Madame le Professeur Touil-Boukoffa C., qui nous a fait l'honneur d'apprécier ce travail et de présider le Jury. Agréez, Madame Touil-Boukoffa C., mes sentiments de respect et d'estime.
- ❖ Monsieur le Professeur Bakour R., qui nous fait l'honneur de juger ce travail et de l'examiner. Veuillez trouver ici Monsieur Bakour R. l'expression de ma sincère gratitude.
- ❖ Madame le Docteur Hammoudi-Triki D., à qui j'exprime ma reconnaissance pour les conseils avisés qu'elle m'a prodigué tout au long de mon cursus universitaire en graduation et post-graduation. Qu'elle agrée mes vifs remerciements.
- ❖ Madame le Docteur ADI-BESSALEM S., que je veux remercier pour les discussions scientifiques et son accueil chaleureux. Veuillez accepter ici Madame ADI-BESSALEM S., l'expression de mon profond respect et de ma reconnaissance.
- ❖ Monsieur le Docteur BENZAID A., qui nous fait un grand honneur en acceptant de juger ce travail. Veuillez trouver ici l'expression de ma respectueuse considération et de mes remerciements les plus sincères.
- ❖ Monsieur BENHIDOUR AEK., pour ses précieux conseils, son accueil chaleureux au sein de son Laboratoire de Recherche et Développement sur les Anticorps Monoclonaux. Veuillez trouver ici l'expression de mes remerciements les plus sincères.

J'exprime également mes sincères remerciements à Mesdames et Messieurs les Professeurs CHAIEB S., KRAIBA R., BOUYOUCEF SE., et GRYENE L., Chefs de Service, respectivement du Laboratoire d'Immunologie de l'Hôpital Central de l'Armée, du Laboratoire d'Hormonologie du Centre Pierre et Marie Curie d'Alger, de la Médecine

Nucléaire du Centre Hospitalo-universitaire de Maillot, et du Laboratoire d'Endocrinologie du Centre Pierre et Marie Curie d'Alger pour leurs encouragements et pour m'avoir généreusement accueillie dans leurs services. Je remercie vivement tous les membres de leurs équipes respectives, en particulier : Betka A., Djettout R., Kemikem S., Mouhoub S., Seghir S., Tounsi FZ., Zemoul SA., pour leur aide, et leur serviabilité.

Je ne saurais oublier mes chers collègues : Aissani R., Allouache L., Ansour L., Bekkari N., Bouaziz S., Boukari R., Charellah A., Chelghoum H., Djeraba Z., Guestini F., Hamimi C., Lammali A., Lenchi N., Nakib I., Rafa H., Rahim I., Rahim M., Rebah N., Saidi H., Slimani R., Tchakal A. Je vous remercie pour votre aide et soutien et surtout pour votre sympathie.

Mes remerciements s'adressent également à toute l'équipe du Laboratoire de Biologie Cellulaire et Moléculaire de la Faculté des Sciences Biologiques : Adi-Bessalem S., Amrouche L., Amrani F., Boussag-Abib L., Bennacef-Heffar N., Bennacef-Chaou N., Boukhalifa-Abib H., Cherifi F., Halladj F., Hamza L., Kamel A., Mendil A., Oussedik-Oumehdi H., Sami-Merah S., Saadedine S., Saci A, pour toute la gentillesse qu'ils m'ont toujours témoignée.

Merci enfin à tous les collègues et le personnel de la Division des Radiosotopes du Centre de Recherche Nucléaire de Draria, particulièrement à : Bendjazia S., Boudjemai S., Hamdi N., Izarroukène M., Rebbache F., et Taharbouchet N.

TABLE DES MATIERES

RESUME	
DEDICACES	
REMERCIEMENTS	
ABREVIATIONS	
INTRODUCTION GENERALE	1
GENERALITES SUR LES VENINS ET TOXINES SCORPIONIQUES	2
I) SCORPIONS	2
I-1) Définition	2
I-2) Classification des scorpions	2
II) SCORPIONISME EN ALGERIE	2
III) VENINS DE SCORPIONS	3
IV) TOXINES DE SCORPIONS	4
IV-1) Définition	4
IV-2) Classification	4
V) CONSEQUENCES CLINIQUES DE L'ENVENIMATION SCORPIONIQUE....	7
VI) TRAITEMENT DE L'ENVENIMATION SCORPIONIQUE	8
VII) TOXICOCINETIQUE DES VENINS DE SCORPION	8
GENERALITES SUR LA PRODUCTION D'ANTICORPS MONOCLONAUX	
I) INTRODUCTION	9
II) DEFINITION	9
III) OBTENTION D'ANTICORPS MONOCLONAUX MURINS	10
III-1) Immunisation	10
III-1-1) Choix de l'animal	10
III-1-2) Immunisation	11
III-2) Fusion cellulaire	12
III-2-1) Partenaires de la fusion	12
▪ Choix de la souche parentale myelomateuse	
▪ Lymphocytes B	
III-2-2) Fusion	13
III-3) Production d'anticorps monoclonaux	14
III-3-1) Sélection des hybridomes	14
III-3-2) Screening des surnageants	14
▪ Dosage radio immunologique	
▪ Dosage immuno-enzymologique	
III-3-3) Expansion et clonage des hybridomes	18
III-3-3-1) Expansion des hybridomes	18
III-3-3-2) Clonage des hybridomes	18
III-3-4) Production d'anticorps monoclonaux	18
III-3-5) Extraction et Purification des anticorps monoclonaux	19
III-3-6) Conservation des anticorps monoclonaux	19

GENERALITES SUR LE RADIOMARQUAGE DES PROTEINES

I)	INTRODUCTION	20
II)	STRATEGIES DE MARQUAGE	20
II-1)	Critères de sélection de l'isotope	20
II-1-1)	Le rayonnement	20
II-1-2)	La période physique	21
II-1-3)	L'isotope de décroissance	21
II-1-4)	Le mode de production	21
II-1-5)	Caractéristiques idéales d'un isotope	21
II-2)	Stratégie du marquage à l'iode	22
II-2-1)	Isotopes principalement utilisés	22
II-2-2)	Les principales réactions de marquage à l'iode	22
II-2-2-1)	La réaction chimique par voie directe	22
II-2-3)	Les agents d'iodation	23
II-2-3-1)	L'iodure de sodium	23
II-2-4)	Les agents oxydants	23
II-2-4-1)	Oxydation par la chloramine T	23
II-3)	Le marquage au technétium ^{99m}Tc	24
II-3-1)	Propriétés physico-chimiques et obtention de technétium	24
II-3-1-1)	Chimie de technétium	25
II-3-2)	Les complexes organométalliques technétiés (Kits technétiés) ...	26
II-3-2-1)	Structure générale des complexes technétiés	26
II-3-2-2)	La synthèse du complexe technétié	26
II-3-2-3)	Les complexes Tc originaux	26

MATERIEL ET METHODES

Partie I : *PRODUCTION D'ANTICORPS MONOCLONAUX ANTI-Bot III PAR LA TECHNOLOGIE DES HYBRIDOMES*

MATERIEL	27
I) Matériel biologique	27
II) Matériel non biologique	28
METHODES	28
I) PROTOCOLE ET CALENDRIER D'IMMUNISATION	28
II) PRELEVEMENT ET CARACTERISATION DES ANTISERUMS	29
II-1) Prélèvement des antisérums	29
II-2) Caractérisation des antisérums	29
II-2-1) Caractérisation des antisérums par RIA	29
II-2-2) Caractérisation des antisérums par ELISA	30

III)	HYBRIDATION CELLULAIRE	31
III-1)	Préparation des cellules parentales	31
III-1-1)	Préparation des cellules de myélome	31
III-1-2)	Préparation des splénocytes	32
III-2)	Préparation des macrophages péritonéaux	32
III-3)	Fusion avec le PEG	33
IV)	SELECTION DES HYBRIDOMES PRODUCTEURS	33
V)	EXPANSION, AMPLIFICATION ET RESCREENING DES CLONES POSITIFS	34
VI)	CONSERVATION DES MYELOMES	34

**Partie II : ETUDE PHARMACOTOXICOLOGIQUE DES PROTEINES
RADIOMARQUEES**

A)	MATERIEL	35
I)	Matériel biologique	35
II)	Matériel non biologique	35
B)	METHODES	36
I)	MARQUAGE DES TOXINES A L'IODE 125	36
I-1)	Protocole de radioiodation	36
I-2)	Purification des toxines radio marquées	36
II)	MARQUAGE DES PROTEINES AU TECHNETIUM 99M	37
II-1)	Protocole de radiomarquage au ^{99m} Tc	37
III)	CONTROLE DE QUALITE DES PROTEINES RADIOMARQUEES	38
III-1)	Contrôle de la pureté radiochimique	38
III-2)	Activité spécifique	39
III-3)	Activité volumique	39
III-4)	Immuno réactivité	39
III-5)	Stabilité des traceurs peptidiques	39
IV)	ETUDE DE LA BIODISTRIBUTION DES PROTEINES RADIOMARQUEES	40

RESULTATS ET DISCUSSION

**Partie I : PRODUCTION D'ANTICORPS MONOCLONAUX ANTI-Bot III
PAR LA TECHNOLOGIE DES HYBRIDOMES**

I)	DETERMINATION DES TITRES EN ANTICORPS DES ANTISERUMS	41
----	--	----

II) PREPARATION DES CELLULES PARENTALES POUR LA FUSION	41
II-1) Cellules myelomateuses	41
II-2) Cellules spléniques	41
III) FUSION CELLULAIRE	44
III-1) Rendement de fusion	44
III-2) Screening et amplification des hybridomes secteurs	44
Partie II : ETUDE PHARMACOTOXICOLOGIQUE DES PROTEINES RADIO MARQUEES	
I) PREPARATION DES PROTEINES MARQUEES	48
I-1) Marquage à l'iode 125 et contrôle de qualité des traceurs radio iodés	48
I-1-1) Marquage à l'iode	48
I-1-1-1) Paramètres de la réaction de marquage	48
I-1-2) Contrôle de qualité des toxines marquées	48
I-1-2-1) Evaluation des traceurs iodés	48
I-1-2-2) Contrôle de la pureté radiochimique des traceurs iodés	49
I-1-3) Immuno réactivité	51
I-1-4) Stabilité sanguine des traceurs iodés	53
I-1-5) Conclusion	53
I-2) Marquage au technétium 99m et contrôle de qualité des traceurs technetiés	55
I-2-1) Marquage des venins au technétium	55
I-2-2) Contrôle de qualité des traceurs technetiés	55
I-2-2-1) Contrôle de la pureté radiochimique des traceurs technetiés	55
I-2-3) Immuno réactivité	59
I-2-4) Stabilité sanguine des traceurs technetiés	59
I-2-5) Conclusion	59
II) ETUDE PHARMACO TOXICOLOGIQUE DES PROTEINES RADIOMARQUEES	61
II-1) Bio distribution des toxines radio iodées	61
II-2) Bio distribution des venins technetiés	66
II-2-1) Voie sous-cutanée	66
II-2-2) Voie intraveineuse	70
II-3) Bio distribution par l'imagerie scintigraphie	73
DISCUSSION GENERALE	75
CONCLUSION GENERALE	84
PERSPECTIVES	85
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	86
ABSTRACT	
RESUME ARABE	

LISTE DES ABREVIATIONS

Aah	<i>Androctonus australis hector</i>	IMP	Inositol MonoPhosphate
Ac	Anticorps	i.p	Intra péritonéale
Ac*	Anticorps radioactif	ITLC	Instant ThinLayer Chromatography
ACM	Anticorps Monoclonal	ITLC-SG	Instant ThinLayer Chromatography-Silica Gel
ACF	Adjuvant complet de Freund	i.v	Intraveineux
ADN	Acide désoxyribonucléique	KeV	Kilo électron volt
ADP	Adénosine DiPhosphate	Kv	Canal potassique voltage dépendant
Ag	Antigène	Lqq	<i>Leiurus quinquestriatus quinquestriatus</i>
Ag*	Antigène radioactif	MDP	Méthylène DiPhosphate
AIF	Adjuvant incomplet de Freund	Mo	Molybdène
Amm	<i>Androctonus mauretanicus mauretanicus</i>	MOPC	Mineral Oil PlasmaCytoma
AMP	Adénosine MonoPhosphate	OMP	Oxalate MonoPhosphate
APRT	Aminoptérine PhosphoRibosyl Transférase	OPD	O-Phenylène diamine dihydrochloride
AS	Activité Spécifique	PAGE	PolyAcrylamide Gel Electrophoresis
ATP	Adénosine TriPhosphate	PBS	Phosphate buffer saline
AV	Activité Volumique	PEG	PolyEthyleneGlycol
Be	<i>Buthus epeus</i>	PRC	Pureté RadioChimique
Bom	<i>Buthus occitanus mardochei</i>	PRi	Phosphate Ribosyl
Bop	<i>Buthus occitanus paris</i>	PRPP	PhosphoRibosyl-PyroPhosphate
Bot	<i>Buthus accitanus tunetanus</i>	R_f	Référence du front de migration
BSA	Bovine Serum Albumin	RIA	RadioImmunoAssay
Bq	Becquerel	SAV	Sérum Antivenin
CDP	Cytosine DiPhosphate	SDS	Sodium dodécyl sulfate
Ci	Curie	^{99m}Tc	Technétium 99 métastable
CMP	Cytosine MonoPhosphate	TDP	Thymidine DiPhosphate
Cpm	Coups par minute	TK	Thymidine Kinase
CsE	<i>Centruroides sculpturatus</i> Ewing	TMP	Thymidine MonoPhosphate
Css	<i>Centruroides suffusus suffusus</i>	Tpm	tours par minute
CTP	Cytosine TriPhosphate	Ts	<i>Tityus serrulatus</i>
DEAE	DiethylAminoEthyl	TTP	Thymidine TriPhosphate
DHFR	DiHydro Folate réductase	UMP	Uracyl MonoPhosphate
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium	UDP	Uracyl DiPhosphate
DMSO	Diméthyl SulfOxyde	UTP	Uracyl triPhosphate
DTPA	Diéthylène Triamine PentaAcétique		
DL₅₀	Dose létale cinquante		
DO	Densité Optique		
scFv	Single chain Fragment variable		
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay		
Fab	Fragment d'anticorps		
FCS	Fetal calf serum		
GMP	Guanine MonoPhosphate		
GDP	Guanine Di Phosphate		
GTP	Guanine TriPhosphate		
HAMA	Human AntiMouse Antibody		
HAT	Hypoxanthine, Aminoptérine, Thymidine		
HES	Hybridoma Enhancing Supplement		
HGPRT	Hypoxanthine Guanine PhosphoRibosyl Transférase		
HMDP	Hydroxyméthylène Sodium Diphosphonate		
HT	Hypoxanthine, Thymidine		
¹²⁵I	Iode radioactif 125		
icv	Intra-cérébroventriculaire		
IgG	Immunoglobuline de classe G		
i.m	Intramusculaire.		

INTRODUCTION GENERALE

INTRODUCTION GENERALE

L'envenimation scorpionique, de part sa fréquence et sa gravité, représente un problème de santé publique dans de nombreux pays du monde. Les espèces de scorpions dangereuses pour l'Homme appartiennent toutes à la famille des *Buthidae*, répartie dans les pays tropicaux et subtropicaux. En Algérie, deux espèces ; *Androctonus australis hector* (Aah) et *Buthus occitanus tunetanus* (Bot), sont responsables de plus de 40 000 cas de piqûres en moyenne, avec une soixantaine de décès chaque année, recensés par l'Institut National de Santé Publique (INSP) et le Ministère de la Santé et de la Population.

La toxicité du venin de scorpion, chez les mammifères, est principalement attribuée à trois neurotoxines contenues dans le venin d'Aah (les toxines Aah I, Aah II et Aah III), et une toxine dans le venin de Bot (la toxine Bot III). Elles présentent une spécificité et une haute affinité, aux canaux sodium des cellules excitables, qui pourraient engendrer d'importantes perturbations physiopathologiques, conduisant parfois au décès de l'envenimé. L'immunothérapie est, à l'heure actuelle, le seul traitement spécifique contre les envenimations scorpioniques.

Dans le cadre de la lutte anti-scorpionique, plusieurs travaux de recherche ont été entrepris, pour une exploration *in vivo* de la toxicocinétique du venin et de ses toxines, et une amélioration du traitement antivenimeux, en vue d'une meilleure utilisation. Le travail de thèse s'articule en deux parties :

- La première partie est consacrée à l'application de la technologie des hybridomes, en vue de la production d'anticorps monoclonaux dirigés contre la toxine Bot III. Pour cela, un calendrier d'immunisation a été établi selon les travaux menés par Bahraoui *et al.*, 1988. La fusion cellulaire des myélomes et splénocytes est réalisée en présence de l'agent chimique PEG. Enfin le screening des surnageants pour la sélection des hybridomes producteurs sera effectué par les tests ELISA et RIA.
- La deuxième partie sera consacrée à l'étude pharmaco toxicologique des venins de Bot et d'Aah, et de leurs toxines respectives Bot III et Aah II radiomarqués. Cette partie sera abordée selon deux aspects :
 - ✓ Le premier aspect concernera, au préalable les techniques de radiomarquage des biomolécules par l'iode 125 et par le technétium 99m suivie par l'évaluation des molécules marquées par le contrôle de la qualité radiochimique et de la stabilité dans le milieu biologique.
 - ✓ Le deuxième aspect, concernera l'étude de la biodistribution des peptides radiomarqués, *in vivo*, sur deux modèles animaux (rat et souris), envenimés par les voies sous-cutanée ou intraveineuse. Cette étude est effectuée par une cinétique de prélèvements d'organes et d'échantillons sériques ou par détection externe sur gamma camera. Le travail de thèse, sera conclu par une étude comparative des biodistributions des venins par rapport à leur toxines respectives, et aux voies d'injection (sous-cutanée et intraveineuse)

GENERALITES

LES VENINS ET TOXINES SCORPIONIQUES

I) SCORPIONS :

I-1) Définition

Les scorpions constituent au sein des Arthropodes un ordre numériquement mineur (moins de 1500 espèces, toutes venimeuses), mais de grande importance médicale, vu le niveau élevé de la létalité engendrée par leurs piqûres.

La famille des *Buthidae* contient 40% des espèces environ et, à de très rares exceptions près, les espèces dangereuses pour l'Homme. Quatre sous-familles composent cette famille : Les *Buthinae* « Ancien Monde » ; Afrique du Nord et Asie. Les *Centrurinae*, les *Tityinae* et les *Isometrinae* « Nouveau Monde » ; continent américain. (Classification d'après Bücherl, 1971)

I-2) Classification des scorpions :

Espèces de l'ancien Monde : (Tableau I)

Androctonus sp : le genre *Androctonus* comprend plusieurs espèces dangereuses qui couvrent un vaste territoire, du Maroc à l'ouest de la péninsule arabique. Leur distribution est cependant inégale. *A. australis*, grand scorpion jaune, est largement plus répandu, de l'Algérie à l'ouest de l'Égypte et au nord de l'Arabie Saoudite. La sous-espèce dominante en Algérie est *Androctonus australis hector*. Il est considéré comme l'un des scorpions les plus dangereux. Son aire de distribution tend à s'étendre. La toxicité de son venin est élevée, puisqu'il présente une DL₅₀ de 0,25 à 0,4 mg/Kg.

Buthus occitanus : cette espèce occupe un vaste territoire disjoint ; retrouvée au nord du bassin méditerranéen, et sur le pourtour de celui-ci. Elle est présente en Afrique du Nord, du Maroc à l'Égypte et à la Palestine. La sous-espèce *Buthus occitanus tunetanus* est régulièrement à l'origine de piqûres mortelles.

Espèces du Nouveau Monde :

Les espèces dangereuses sont des *Buthidae* des genres *Centruroides* et *Tityus*.

II) SCORPIONISME EN ALGERIE :

En Algérie, l'envenimation scorpionique est principalement provoquée par deux espèces : *Androctonus australis hector* et *Buthus occitanus*, retrouvées dans l'Atlas Saharien, le Sud (Biskra, El oued) et les Hauts Plateaux (Mechria, Ain Safra, Ghardaia, Ouargla, El Bayadh, Ksar Chellala) .

Plus de 40 00 cas d'envenimation sont enregistrés en Algérie chaque année, par l'Institut National de Santé Publique, dont un millier manifeste des troubles systémiques qui requièrent une admission à l'hôpital.

Tableau I : Espèces de scorpions dangereuses pour l'Homme (D'après Bücherl, 1971)

<i>Ancien Monde</i>			
Genre	Espèce	Distribution	Remarques
<i>Androctonus</i>	<i>aeneas</i>	Afrique du nord saharienne	Faible densité
	<i>australis</i>	De l'Algérie à l'Egypte	Plusieurs sous-espèces
	<i>crassicauda</i>	De l'Afrique du nord à l'Arabie Saoudite	Plusieurs sous-espèces
	<i>mauretanius</i>	Endémique du Maroc	
<i>Buthotus</i>	<i>franzwerneri</i>	Endémique du Maroc	2 sous-espèces
	<i>tamulus</i>	Inde	Parfois classées dans les genres <i>Mesobutus</i> / <i>Buthus</i>
<i>Buthus</i>	<i>occitanus</i>	Pourtour méditerranéen, et pays du Sahel	Dangerosité variable
<i>Leiurus</i>	<i>quinquestriatus</i>	Vaste répartition : Afrique, Moyen-Orient	Genre mono espèce
<i>Parabuthus</i>	<i>granulatus</i>	Afrique du sud	Dangerosité mal connue
<i>Hemiscorpius</i>	<i>sp</i>	Afrique de l'est, Arabie Saoudite	
	<i>lepturus</i>	Irak, Iran	Dangerosité mal connue
<i>Nouveau Monde</i>			
Genre	Espèce	Distribution	Remarques
<i>Centruroides</i>	<i>exilicauda</i>	Etats-Unis	Espèces dangereuses
	<i>infamatus</i>	Etats-Unis, Mexique	
	<i>noxius</i>	Mexique	
	<i>suffusius</i>	Mexique	
<i>Tityus</i>	<i>bahiensis</i>	Brésil, Argentine	Parthénogénétique
	<i>serrulatus</i>	Brésil	
	<i>trinitatis</i>	Trinité	

III) VENINS DE SCORPIONS :

Les symptômes de l'envenimation scorpionique sont en général la conséquence des effets combinés des différents composants toxiques et non toxiques contenus dans le venin :

- La fraction non toxique comprend des mucopolysaccharides, de faibles quantités de lipase et de hyaluronidase (Zlotkin et *al.*, 1972), des inhibiteurs de protéases (Chatwal et Habermann, 1981) et, également des molécules bioactives telles la sérotonine et l'histamine (Adam et Weiss, 1959, Master et *al.*, 1963, Ismail et *al.*, 1975) .
- La fraction toxique comprend essentiellement les neurotoxines qui malgré leur faible taux protéique représenté dans le venin, sont responsables de 90% de sa toxicité. Cette toxicité se manifeste au niveau du système nerveux central et, périphérique, ainsi que les muscles cardiaque et squelettiques (El Ayeb et *al.*, 1989) . Elle est généralement évaluée en DL₅₀ chez la souris, en conditions standardisées.

IV) TOXINES DE SCORPION :

IV-1) Définition :

Il s'agit de polypeptides basiques monocaténares de faible masse moléculaire (3 à 7 KDa), constitués de 31 à 70 résidus d'acides aminés, réticulés par 3 à 4 ponts disulfures ; ayant une conformation tridimensionnelle très compacte caractérisée par un squelette organisationnel commun à toutes les toxines scorpioniques, et sont constituées de la région $\beta\alpha\beta$: un triple brin antiparallèle de feuillets β reliés à l'hélice α par deux ponts disulfures, un troisième pont reliant le feuillet β à une boucle dont la séquence responsable de l'action pharmacologique et de la spécificité antigénique de chaque toxine, est variable d'une toxine à l'autre. (Miranda *et al.*, 1964 ; Miranda *et al.*, 1970, Rochat *et al.*, 1970 ; Kopeyan *et al.*, 1974 ; Fontecilla Camps *et al.*, 1982 ; Martin et Rochat, 1986, Darbon *et al.*, 1982 ; Legros et Martin-Eauclaire, 1997 ; Possani *et al.*, 1999 ; Catterall, 1980).

IV-2) Classification :

Quatre familles de neurotoxines sont recensées, en fonction de la cible :

- **Les toxines actives sur les canaux sodium (toxines longues)** sont constituées de 60 à 65 résidus d'acides aminés (6 à 7 KDa), réticulés par quatre ponts disulfures. Elles sont les plus abondantes dans le venin et responsables quasi exclusives de la symptomatologie de l'envenimation.

L'homologie de séquence des toxines actives sur les canaux sodiques des mammifères a permis d'identifier 6 groupes structuraux (Rochat *et al.*, 1970 ; Kopeyan *et al.*, 1974 ; Martin-Eauclaire *et al.*, 1999). (Figure 1)

Quatre groupes pharmacologiques de ces toxines ont été caractérisés : (Tableau III)

1. Le premier groupe inclut les **toxines α** ; présentes dans les venins de la sous-famille des *Buthidae*, elles affectent mammifères et /ou insectes, en se fixant avec une affinité élevée (proche de 10^{11} M), sur le site 3 du canal sodium de manière dépendante du potentiel des cellules excitables dont elles perturbent les fonctions biologiques, provoquant ainsi une prolongation caractéristique extrême du potentiel d'action d'inhibition de la phase d'inactivation du canal sodium (génération et propagation des potentiels d'action (Miranda *et al.*, 1970 ; Martin et Rochat, 1986 ; Martin *et al.*, 1987 ; Legros et Martin-Eauclaire, 1997, revue Catterall, 2003). Elles induisent alors une stimulation neuronale de type pré synaptique qui a pour conséquence une libération massive de neuromédiateurs (phase excitatoire) précédant une phase de blocage de la transmission après dépolarisation (paralysie).
2. Le deuxième groupe inclut les **toxines β** ; présentes dans les genres *Tityus* et *Centronoides*. Elles se fixent sur le site 4 du canal sodium de façon indépendante du potentiel membranaire en induisant son activation à des potentiels plus bas et le déclenchement des trains de potentiels d'action. (Delori *et al.*, 1981 ; El Ayeb *et al.*, 1983 et 1985 ; Martin-Eauclaire et Couraud, 1995).
3. Le troisième groupe inclut les toxines dépressives anti-insectes induisant leur paralysie (Lester *et al.*, 1982 ; Zlotkin *et al.*, 1985, 1991 ; Kopeyan *et al.*, 1993).

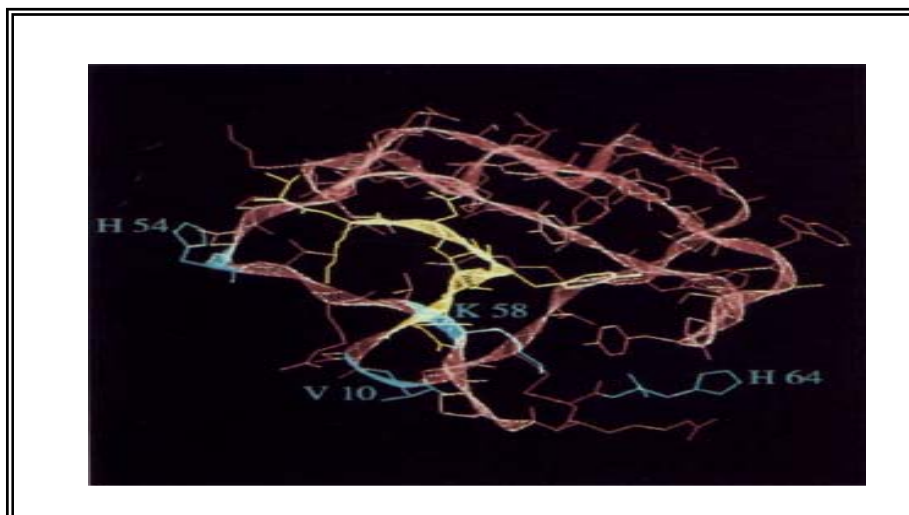


Figure 2 : structure tridimensionnelle d' Aah II établie par Cristallographie aux rayons X à très haute résolution (0,8Å°) (Fontecilla Camps *et al.*, 1982)

(Squelette en rose, epitopes1-8 en jaune, résidus de l'épitope reconnus par Mab 4C1 en vert)

Treize toxines anti-mammifères ont été purifiées et caractérisées à partir du venin de *Buthus occitanus tunetanus* (Miranda *et al.*, 1970), Elles appartiennent à deux groupes structuraux et immunologiques distincts. (Rochat *et al.*,1979, El-Ayeb *et al.*, 1983) La plus active est la toxine Bot III qui se rapproche sur le plan antigénique, à la toxine Aah II du scorpion *Androctonus australis hector*. (Bouhaouala-Zahar *et al.*, 1996). Moins abondante dans le venin total (seulement 0,23% par rapport à Bot I (0,42%) et Bot II (0,35%) est cependant la plus toxique (44,7 fois plus toxique que le venin brut). Elle présente une DL₅₀ de 0,41µg en sous-cutané pour 20g de souris (Tableau II).

Les toxines identifiées, purifiées, séquencées et caractérisées à partir des deux espèces Aah et Bot appartiennent à trois groupes structuraux et d'homologie antigénique (Tableau III). Des anticorps préparés contre une toxine d'un groupe structural sont capables de neutraliser les toxines appartenant à ce même groupe.

Tableau II : Caractéristiques biochimiques des venins d'Aah et de Bot et de leurs neurotoxines (Miranda, *et al.*, 1970)

Venins et leurs toxines	DL ₅₀ (µg /20g de souris)	Toxicité par rapport au venin brut (nombre de fois)	Pourcentage de toxines dans le venin brut (%)	Poids moléculaire
<i>Androctonus australis hector</i>				
Venin brut	8,4	/	/	/
Toxine I	0,34	28,0	0,45	6808
Toxine II	0,18	42,0	1,13 }1,74	7249
Toxine III	0,45	18,6	0,16	6826
<i>Buthus occitanus tunetanus</i>				
Venin brut	17,85	/	/	/
Toxine I	1,82	9,6	0,42	6919-6933
Toxine II	2,87	6,1	0,35	7539
Toxine III	0,41	44,7	0,23	7270

Tableau III : Classification des toxines scorpioniques en fonction des critères structuraux (Rochat *et al.*, 1979) et immunologiques (Delori *et al.*, 1981)

	Groupes	Critères structuraux	Critères immunologiques
Toxines alpha	1	Aah I, Aah I', Aah I'', Aah III, Amm III	Aah I, Aah III
	2	Aah II, Amm V, Bot III, Bot XI, Lqq V	Aah II, Amm V, Bot III, Bot XI, Lqq V
	3	Lqq IV	Lqq IV
	4	Bot I, Bot II, Bot VIII, Bop I, Bop II, Lqq III	Bot I, Bot II, Bot IV, Bot V, Bot VII, Bot VIII, Bot IX, Bot X
Toxines bêta	5	Css II, CsE V3, CsE I, Ts VII	/
	6	Ts II, TsT X-VI	/

Aah (*Androctonus australis Hector*), **Amm** (*Androctonus mauretanicus mauretanicus*), **Bot** (*Buthus occitanus tunetanus*), **Bop** (*Buthus occitanus parisi*), **Lqq** (*Leiurus quinquestriatus quinquestriatus*), **Css** (*Centruroides suffusus suffusus*), **Ts** (*Titvus serrulatus*).

V) CONSEQUENCES CLINIQUES DE L'ENVENIMATION SCORPIONIQUE :

Lors d'une piqûre de scorpion, une très petite quantité de venin est inoculée, suffisamment responsable de l'apparition rapide de symptômes divers allant depuis les signes localisés isolés, correspondant à des douleurs localisées, réaction inflammatoire et engourdissement, jusqu'aux manifestations systémiques représentant une réelle menace pour le pronostic vital du patient, à savoir l'état de choc (troubles cardiovasculaires et respiratoires, coma profond), en passant par les symptômes les plus généraux tels que frissons, sudation, salivation, nausées, vomissements, diarrhées, modification de la pression artérielle, hyperthermie, prostration.

Une classification basée sur la sévérité croissante des manifestations cliniques de l'envenimation scorpionique a été rapportée. Le Grade I (envenimation bénigne) correspond aux manifestations locales isolées; le Grade II (envenimation modérée) correspond aux manifestations systémiques d'envenimation sans défaillance vitale; le Grade III (envenimation grave) correspond aux envenimations dont les manifestations cliniques peuvent mettre en jeu à court terme le pronostic vital des patients.

VI) TRAITEMENT DE L'ENVENIMATION SCORPIONIQUE :

L'immunothérapie passive est, à l'heure actuelle, le seul traitement spécifique des envenimations chorioniques graves. Ce traitement est basé sur l'utilisation d'anticorps polyclonaux hétérologues dirigés, soit contre le venin d'une espèce unique (sérum monovalents), soit contre le venin de plusieurs espèces (sérum polyvalents). Il n'existe pas d'antivenin universel, en raison de l'endémicité des scorpions. Ainsi les antivenins sont largement utilisés en Algérie, en Tunisie, en Egypte, en Arabie Saoudite, au Brésil et au Mexique. (Abroug *et al.*, 1999, Ismail.2003)

VII) TOXICOCINETIQUE DES VENINS DE SCORPION :

Les observations cliniques rapportées sur l'évolution de la symptomatologie chez les patients victimes des piqûres de scorpions, sont liées au profil toxicocinétique du venin ; caractérisé par une diffusion rapide des toxines à partir du site de piqûre vers les compartiments vasculaire puis tissulaires. La demi-vie de distribution est estimée à 4-7 minutes, pour une demi-vie d'élimination lente variant de 4,2 à 13,4 heures. (Ismail *et al.*, 1980 et 1995 ; Ismail et Abd Essalem.1988 ; Hammoudi-Triki et Laraba-Djebari. 2003 ; Hammoudi-Triki *et al.*, 2007)

L'étude de la biodistribution a fait l'objet de bien des travaux de recherche, entrepris dans le but d'établir une corrélation entre le degré de toxicité des venins et la gravité de l'envenimation. Afin d'optimiser l'immunothérapie antivenin, une compréhension de la toxico-cinétique des venin *in vivo* s'impose.

Des envenimations expérimentales par différentes voies d'injection, ont été effectuées sur plusieurs modèles animaux, puis évaluées par des techniques de dosage ELISA et RIA. Les résultats obtenus convergent vers les mêmes conclusions, et affirment bien les conséquences physiopathologiques observées cliniquement chez l'envenimé.

Le venin scorpionique présente des cinétiques rapides de diffusion et de distribution vers les compartiments vasculaire et tissulaires à partir du site d'injection (Ismail *et al.*, 1992, 1998 ; Santana *et al.*, 1996 ; Bessalem *et al.*, 2002 ; Hammoudi-Triki *et al.*, 2004), sans pour autant traverser la barrière hémato-encéphalique. (Clot-Faybesse *et al.*, 2001). Sa distribution est observée dans l'ensemble des organes avec des concentrations élevées dans les reins, les poumons, le cœur et le foie. (Ismail et Abd-Essalem, 1988 ; Revelo *et al.*, 1996 ; Clot-Faybesse *et al.*, 2000)

La cinétique de distribution de venin de *Buthus occitanus tunetanus*, a été explorée par Krifi et collaborateurs (2001), après injection intraveineuse ou sous-cutanée aux lapins. Les paramètres pharmacologiques déterminés n'ont fait qu'étayer les résultats obtenus. Les neurotoxines Aah I, Aah II et Aah III du venin d'*Androctonus australis hector*, ont été quantifiées par Devaux et collaborateurs (2004), après injection du venin total par les voies sous-cutanée ou intraveineuse, à deux modèles expérimentaux. Il a été démontré par ces travaux que les toxines présentent une toxicocinétique différente que celle du venin brut et est caractérisée par des diffusions et distribution rapides, suivies d'une élimination lente par la voie rénale, avec fixation prolongée au niveau des organes cibles. Aussi, Il a été conclut, qu'il existe un polymorphisme dans les sécrétions venimeuses entre les individus de la même espèce.

LA PRODUCTION D'ANTICORPS MONOCLONAUX

I) INTRODUCTION :

L'une des caractéristiques les plus frappantes du système immunitaire, est la remarquable spécificité de la réponse immune. Cette spécificité, liée au fait qu'un anticorps donné ne peut reconnaître et se lier qu'à un seul type d'antigène, constitue la base de l'utilisation des anticorps en tant qu'outil puissant d'étude en biologie cellulaire et en biochimie. Pendant longtemps, une telle utilisation d'anticorps n'a pu se concrétiser en raison de la nature poly clonale des anticorps produits chez l'animal en réponse à l'injection d'un antigène donné. Il existe en effet habituellement sur les macromolécules plusieurs déterminants antigéniques qui suscitent la production d'autant d'anticorps différents.

La découverte de la production d'anticorps monoclonaux lève les difficultés rencontrées avec les anticorps conventionnels, puisque l'on peut envisager une standardisation poussée ainsi que des méthodes de production continue et en quantité élevée.

II) DEFINITION :

Les anticorps monoclonaux sont des immunoglobulines identiques les une aux autres, synthétisés par un seul clone de lymphocytes B rendus artificiellement immortels et cultivés *in vitro* ou *in vivo*. Plusieurs faits scientifiques indépendants mais néanmoins convergents ont conduit à cette découverte :

- La vérification de la théorie de la sélection clonale s'est faite lorsque l'on a élucidé la nature des protéines synthétisées par les cellules de myélomes ou de plasmocytomes ;
- Barski et son équipe ont découvert dès 1960, la technique de l'hybridation cellulaire : fusion en une cellule hybride stable de deux cellules provenant de lignées parentales différentes ;
- En 1973, Cotton et Milstein pratiquent la fusion de deux cellules de myélomes, afin de comparer la structure des immunoglobulines issues de l'hybride par rapport à celles synthétisées par les parents ;
- En 1975, César Milstein et Georges Kohler (prix Nobel de médecine en 1981) ont mis au point une technique qui a permis de s'affranchir du problème lié à l'hétérogénéité des anticorps et de produire une source permanente d'anticorps monoclonaux.

Les avantages d'un tel anticorps par rapport aux immun-sérums sont importants : les hybridomes sont gardés en culture *in vitro* sans modification de l'anticorps qu'ils produisent. Ils peuvent être conservés par congélation sans perte de leur propriété de sécrétion d'anticorps. Ce qui permet de disposer d'une source illimitée de cellules produisant toujours le même anticorps, ayant la même affinité et les mêmes propriétés physico-chimiques. Enfin, l'ADN codant les chaînes lourdes et légères de cet anticorps peut être isolé et cloné à des fins d'ingénierie moléculaire. Il devient alors possible de concevoir de nouveaux formats de molécules à activité anticorps aux propriétés améliorées et mieux adaptées à des applications thérapeutiques.

III) OBTENTION D'ANTICORPS MONOCLONAUX MURINS :

Plus de dix ans après sa découverte, la technique des hybridomes et leur production d'anticorps monoclonaux n'a pas fondamentalement évolué. Elle a été améliorée en nombreux points, mais la technique dans son ensemble a trouvé sa plénitude dès sa naissance.

La technique consiste, comme indiqué dans la figure 3, à faire fusionner des cellules normales productrices d'anticorps (lymphocytes B issus de la rate prélevée chez une souris préalablement immunisée avec un antigène choisi), avec des cellules cancéreuses (cellules myélomateuses mutantes, non productrices d'anticorps et maintenues en culture).

Les cellules résultantes sont de nature hybride d'où le nom d'hybridome qui leur a été donné. Dans ces cellules hybrides deux caractères remarquables sont réunis :

- le premier caractère apporté par le lymphocyte B d'origine splénique est la capacité de synthétiser un seul type d'anticorps spécifiques de l'antigène immunisant et relatifs aux lymphocytes qui leur ont donné naissance.
- Le deuxième caractère apporté par les cellules myélomateuses, est l'immortalité relative aux cellules cancéreuses.

La technique compte trois étapes principales :

- Immunisation ;
- Fusion
- Détection des anticorps monoclonaux.

III-1) Immunisation :

III-1-1) Choix de l'animal :

La production industrielle d'anticorps monoclonaux utilise deux systèmes animaux : souris, rat. Le système murin a été le premier utilisé par Kohler et Milstein et la grande majorité des hybridomes décrits à ce jour proviennent de l'utilisation de souris.

Malgré certains avantages par rapport au système murin, le système relatif au rat est encore peu utilisé, (rendement de production *in vivo* dix fois supérieur à la souris, démontré par Galfre en 1981, 90 % des hybridomes de rat expriment un anticorps contre 60 % chez la souris) .

Les souris Balb/c constituent l'une des souches les plus utilisées pour la production d'anticorps monoclonaux.

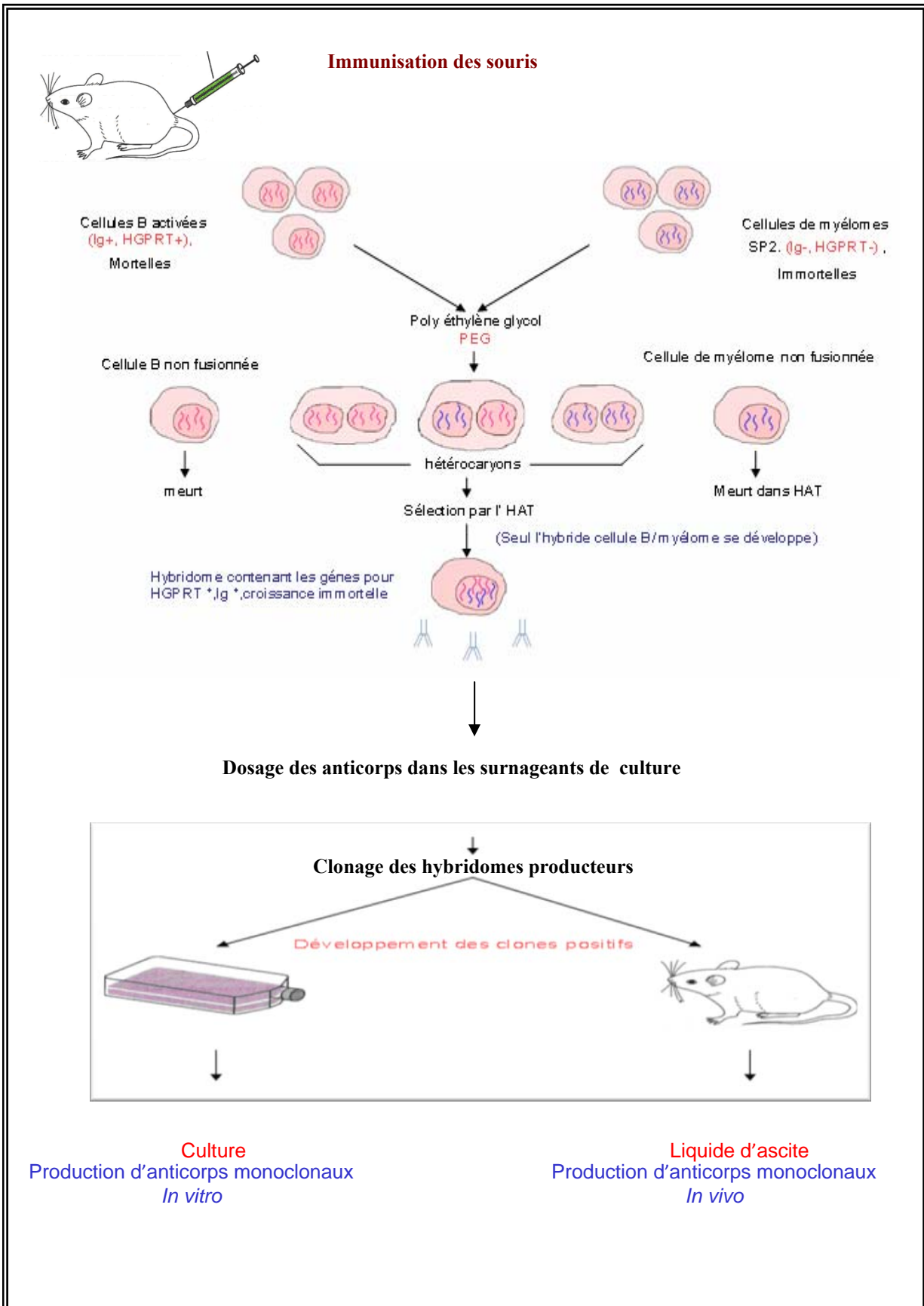


Figure 3 : Schéma général des principales étapes de production d'anticorps monoclonaux chez les rongeurs par la technologie des hybridomes. (Goldsby et al., 2001)

III-1-2) Immunisation :

L'immunisation de l'animal sur lequel seront prélevés des lymphocytes partenaires de la fusion est une phase nécessaire qui provoque non seulement une expansion clonale des lymphocytes désirés, mais aussi une division ; une différenciation et une diffusion dans la circulation générale, augmentant ainsi les chances d'obtention d'hybridomes recherchés.

En effet, les expériences montrent (Stahli *et al.*, 1980) que les cellules qui fusionnent préférentiellement sont les lymphocytes B engagés en réponse anamnésique (ou réponse secondaire précoce).

L'immunogénécité d'une molécule est liée à son habilité d'activer le système immunitaire. Les paramètres majeurs à considérer lors de la sélection d'un immunogène sont:

- La pureté de l'antigène injecté est requise, bien que la théorie ne l'exige pas
- La taille : On distingue les antigènes qui sont spontanément immunogènes et les haptènes (Bador *et al.*, 1992)
- L'hétérogénéité : Les hétéro polymères sont régulièrement efficaces dans la génération de la réponse immunitaire.
- La nature chimique : Les protéines et les glycoprotéines sont les plus immunogènes.
- La conformation : Il est important de considérer l'état natif ou dénaturé de l'antigène. (Ritter *et al.*, 1995 ; Lydyard *et al.*, 2002).

L'immunisation d'animaux comporte au moins trois étapes :

- **Stimulation antigénique primaire** : où l'antigène pur, mélangé à une quantité égale de l'adjuvant complet de Freund (liquide huileux contenant un mélange de bacilles tuberculeux morts), est injecté à l'animal âgé de 6 à 10 semaines par voie sous-cutanée ou intradermique .

La réponse antigénique est améliorée par l'utilisation d'adjuvants, et ce dans le but d'accroître le pouvoir immunogène des substances qui lui sont associées . L'adjuvant intervient d'une part dans le maintien momentané de l'antigène au point de l'injection pour une libération prolongée et progressive soumettant ainsi l'organisme à une stimulation continue; et d'autre part dans la stimulation de la sécrétion de facteurs activateurs des macrophages augmentant ainsi la vitesse de la phagocytose. (Harlow *et al.*, 1991). Le plus utilisé est l'adjuvant de Freund complet ou incomplet. (Janway *et al.*, 2003)

- **Stimulation antigénique secondaire** : après une période variant entre 14 et 21 jours précédant la première immunisation. Une stimulation secondaire est entreprise , cette fois-ci, par voie intra- péritonéale , en utilisant le même protocole que précédemment .

Les anticorps produits lors de la réponse immunitaire primaire ont habituellement une affinité plus faible pour l'antigène que ceux produits au cours de la réponse immunitaire secondaire.(Wilsson *et al.*, 1993)

Un prélèvement sanguin peut être effectué au cours de cette étape. Si l'on se trouve en phase exponentielle de sécrétion d'anticorps, une fusion peut être envisagée avec optimisme quant au nombre d'hybridomes formés.

- **Rappel final** : Trois à cinq jours avant la fusion, la souris immunisée reçoit le dernier rappel en intraveineux et en intra péritonéal. L'injection doit être effectuée au moins trois semaines après l'injection précédente. La dernière injection est utilisée à deux fins : d'une part, obtenir une réponse forte et de qualité et, d'autre part, synchroniser la maturation de la réponse.

III-2) Fusion cellulaire :

III-2-1) Partenaires de la fusion :

- **Choix de la souche parentale myelomateuse** : (Figure 4)

Le choix des cellules partenaires de la fusion est fondamentalement basé sur le fait que les genres parentaux au sein de l'hybridome sont exprimés de façon codominante, et c'est pour cette raison que les myélomes sélectionnés pour la production d'anticorps monoclonaux sont maintenus en culture et remplissent les deux conditions ; de la non sécrétion d'immunoglobulines et, de la déficience en l'une des deux enzymes du métabolisme exogène des bases nucléiques puriques et pyrimidiques; constituants nécessaires à l'édification de l'acide désoxyribonucléique (ADN), à savoir la thymidine kinase (TK) pour le métabolisme pyrimidique ou l'Hypoxanthine Guanine Phospho Ribosyl Transférase (HGPRT) pour le métabolisme purique.

La plupart des myélomes murins ont été isolés à partir de souris BALB/c par Potter (1972); ces cellules ont été désignées par le sigle MOPC (pour Mineral Oil PlasmaCytoma). Certains myélomes dérivés de BALB/c Sont devenus les partenaires de fusion les plus communément utilisés dans les laboratoires.

Les myélomes possèdent toute la machinerie nécessaire à la sécrétion d'anticorps et nombre d'entre eux en sécrètent effectivement. Pour éviter l'obtention d'hybridomes sécrétant plus d'un type d'anticorps, les myélomes utilisés comme partenaire de fusion ont été sélectionnés *in vitro* et ne produisent plus eux-mêmes d'anticorps fonctionnels.

- **Les lymphocytes B** :

L'autre partenaire de la fusion est constitué par des lymphocytes B provenant d'animaux immunisés. Ces lymphocytes B doivent évidemment posséder les gènes d'immunoglobulines correctement réarrangés, conduisant à la production d'anticorps spécifiquement dirigés contre l'antigène concerné. En raison des difficultés de purification de telles cellules, les fusions sont habituellement effectuées avec un mélange cellulaire isolé à partir de l'un des organes lymphoïdes de l'animal immunisé.

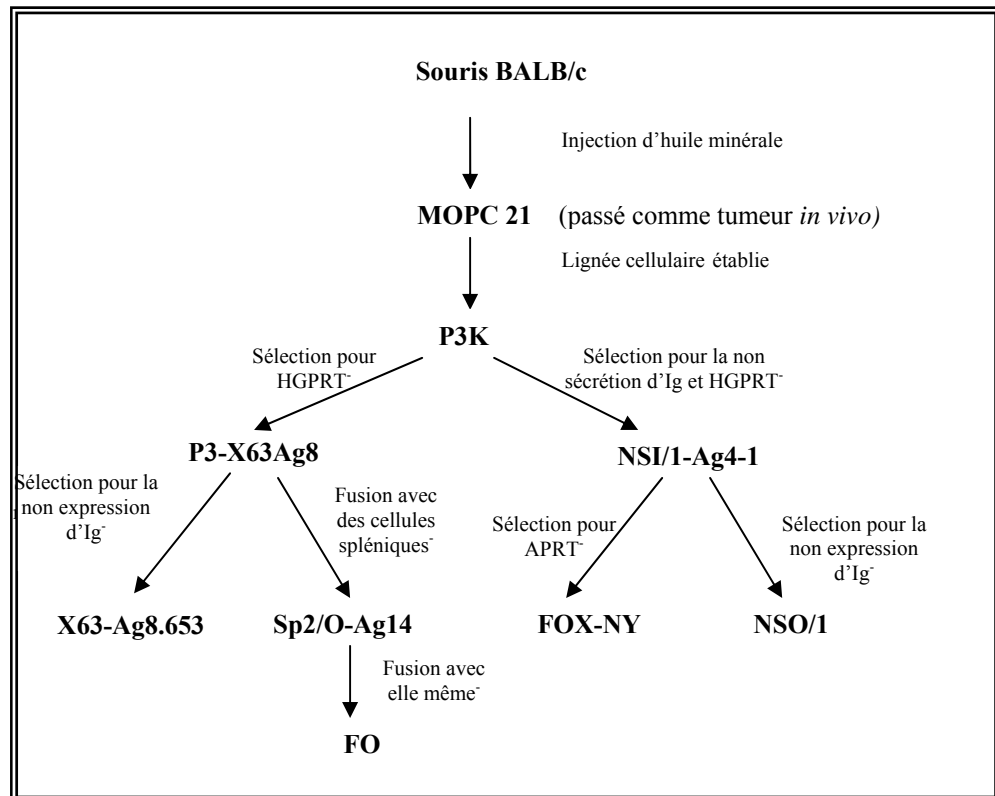


Figure 4 : Origine et généalogie des myélomes utilisés pour les fusions.
Potter (1972), Horibata et Harris (1970); Kohler et Milstein (1975); Kearney et coll. (1979); Shulman et coll. (1978); de St Groth et Scheidegger (1980); Kohler et coll. (1976); Taggart et Samloff (1982); Galfre et Milstein (1981).

III-2-2) Fusion :

Trois procédés permettent la fusion cellulaire des lymphocytes B et myélomes :

- Fusion par le virus Sendai ;
- Fusion par électro-fusion ;
- Fusion par le PEG.

La technique utilisant du PEG comme agent de fusion des cellules de mammifères a été mise au point par Pontecorvo (1975) et, a été rapidement adoptée par les généticiens des cellules somatiques. Le PEG est un outil de choix pour la production d'hybridomes, car il permet de fusionner rapidement et facilement les cellules de mammifères.

Le PEG, de formule chimique $\text{HO}(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_n \text{H}$, détruit les forces de tension de surface qui empêchent habituellement les cellules de s'accoler lorsqu'elles sont en suspension. En présence de PEG, les cellules peuvent entrer en contact intime. Leurs membranes fusionnent de façon à permettre au noyau d'une cellule d'entrer dans le cytoplasme de l'autre.

Les hybrides néoformés sont cultivés dans un milieu sélectif : le HAT, ne permettant ainsi que la survie et la croissance des hybridomes.

III-3) Production d' anticorps monoclonaux :

III-3-1) Sélection des hybridomes : (Figure 5)

Pour faciliter la sélection des cellules de fusion, les cellules de myélome utilisées sont déficientes en une enzyme, habituellement l'Hypoxanthine-Guanine PhosphoRibosyl-Transférase (HGPRT⁻), ou plus rarement, la Thymidine Kinase (TK⁻). En effet, ces deux enzymes assurent une étape essentielle de la voie alterne de synthèse des nucléotides (la catalyse de la réaction entre une base purique et un phosphoribosyl-pyrophosphate, conduisant à la formation d'un nucléotide purique monophosphate). Leur déficit conduit obligatoirement la cellule à utiliser la voie de néo synthèse des nucléotides, qui pourra être bloquée par des drogues telles que l'aminoptérine, l'azaserine ou le méthotrexate.

Par ailleurs, les cellules de souris les plus utilisées comme partenaires de fusion, P3-X63.Ag8 et Sp2/0-Ag14, dérivées du myélome MOPC 21, sont des variants qui ont perdu la capacité de synthétiser leur propre chaîne lourde et légère d'immunoglobuline. Une fois la fusion effectuée, les cellules hybrides sont mises en culture dans un milieu contenant un agent de sélection, en général l'aminoptérine. Cette drogue bloque la seule voie de synthèse de nucléotides restant aux cellules parentales de myélome déficientes en enzyme HGPRT ou TK.

Elle permet ainsi la sélection des cellules hybrides, qui, par complémentation génique, expriment une enzyme fonctionnelle (HGPRT⁺ ou TK⁺) et qui sont donc capables d'utiliser la voie alterne de synthèse de nucléotides à partir de nucléosides. L'apport d'hypoxanthine exogène dans le milieu de culture permet alors de satisfaire les besoins en purines. Le milieu de sélection contient également de la thymidine, et de l'aminoptérine ; un anti-folate qui bloque aussi la thymidylate synthase. Les lymphocytes B normaux, isolés de la rate ou des ganglions, incapables de se répliquer longtemps *in vitro*, vont, quant à eux, disparaître en quelques jours.

III-3-2) Screening des surnageants :

Environ une semaine après la fusion, la présence d'anticorps spécifiques sera recherchée dans les surnageants de culture des hybridomes. Des échantillons de surnageants de culture sont prélevés des puits où poussent des hybridomes et sont testés pour la présence des anticorps spécifiques. Les fusions couronnées de succès permettent l'obtention de 200 à 20 000 colonies d'hybridomes, 500 à 1 000 colonies étant la norme. Les premiers puits sont normalement prêts à être évalués aux septième et huitième jours après la fusion et, la majorité des puits doivent être évalués dans les quatre ou cinq jours qui suivent.

Plusieurs techniques permettent le criblage des hybridomes producteurs de l'anticorps d'intérêt : les tests radio immunologique et immuno enzymatique sont les plus couramment utilisés.

Dosage radioimmunologique : (Figure 6)

Cette technique encore appelée radioimmunoassay (RIA) est très sensible. La technique de base repose sur la détection d'une émission radioactive par les anticorps, lorsqu'ils se lient à une molécule cible, ou à un complexe Antigène -Anticorps, eux- mêmes fixés sur un support.

Le signal radioactif émis par chaque phase en milieu réactionnel, libre ou lié à l'anticorps, permet de déduire leur concentration dans le liquide biologique. La sensibilité de cette méthode est de l'ordre de ng/ml, donc fréquemment utilisée pour le dosage de molécules à faible concentration.

Dosage immuno-enzymologique : (Figure 7)

Les méthodes immuno-enzymatiques présentent un avantage par rapport à la précédente, elles sont faciles à réaliser, et automatisables d'où leur diffusion large dans de nombreux laboratoires de biologie. La révélation de la réaction Ag-Ac est réalisée grâce la fixation d'une enzyme (phosphatase alcaline, peroxydase) à l'un des réactifs, l'antigène ou anticorps, et à l'utilisation d'un substrat chromogène de l'enzyme.

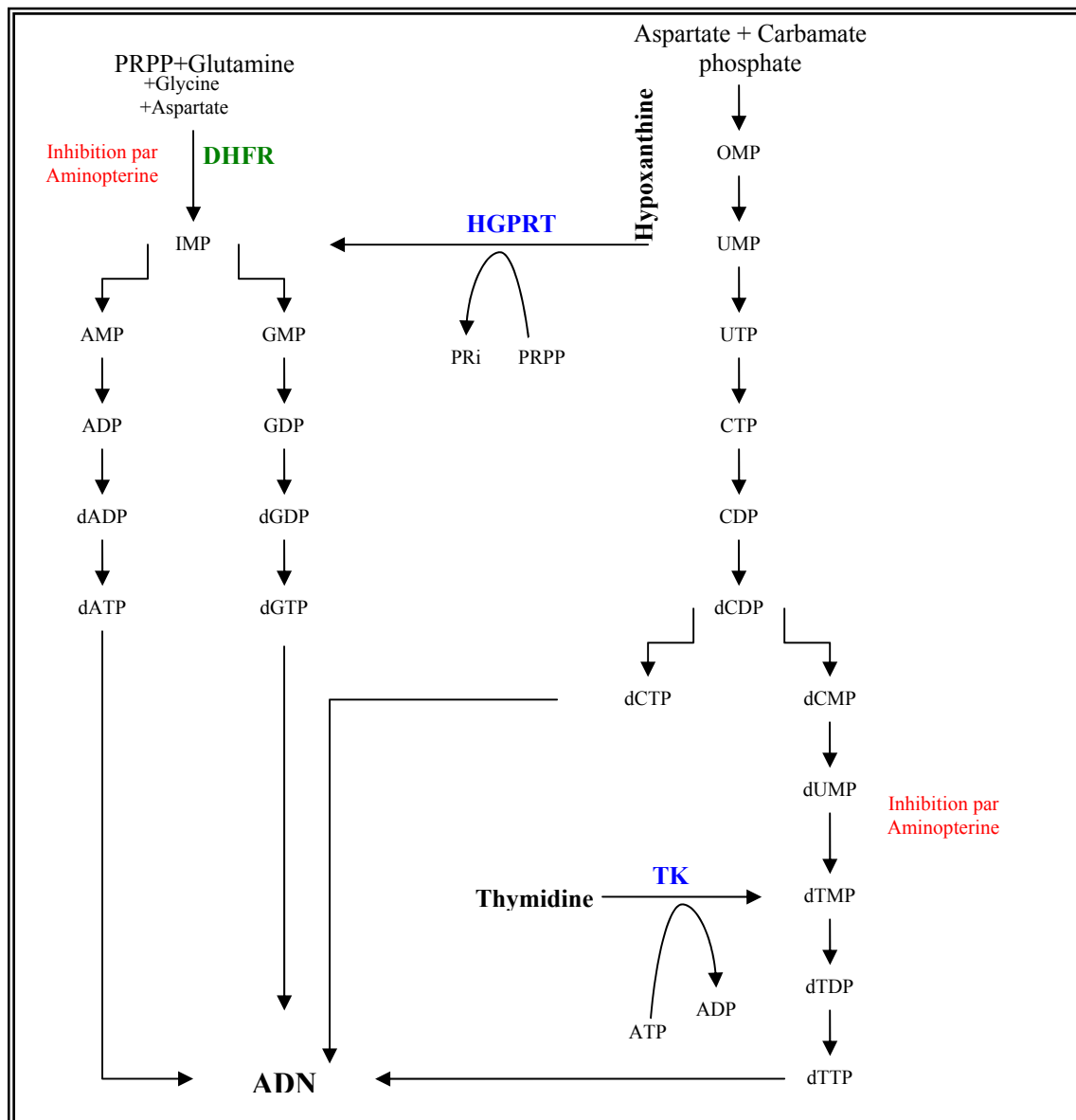


Figure 5 : Les voies de synthèse du DNA (Campbell, 1984)

DHFR (DiHydroFolate Réductase), **HGPRT** (Hypoxanthine-PhosphoRibosyl-Transférase), **TK** (Thymidine Kinase)

Bleu : enzymes de la voie exogène, **vert :** enzyme de la voie endogène

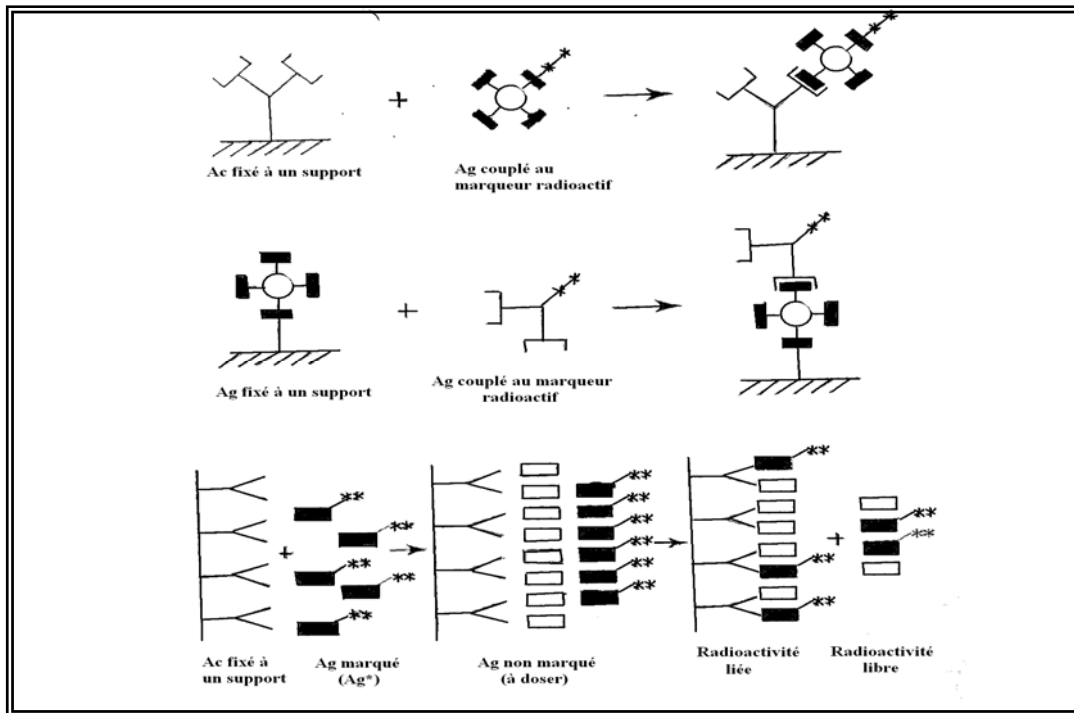


Figure 6 : Dosage Radio immuno Assay. (RIA)
(Genetet . 2003)

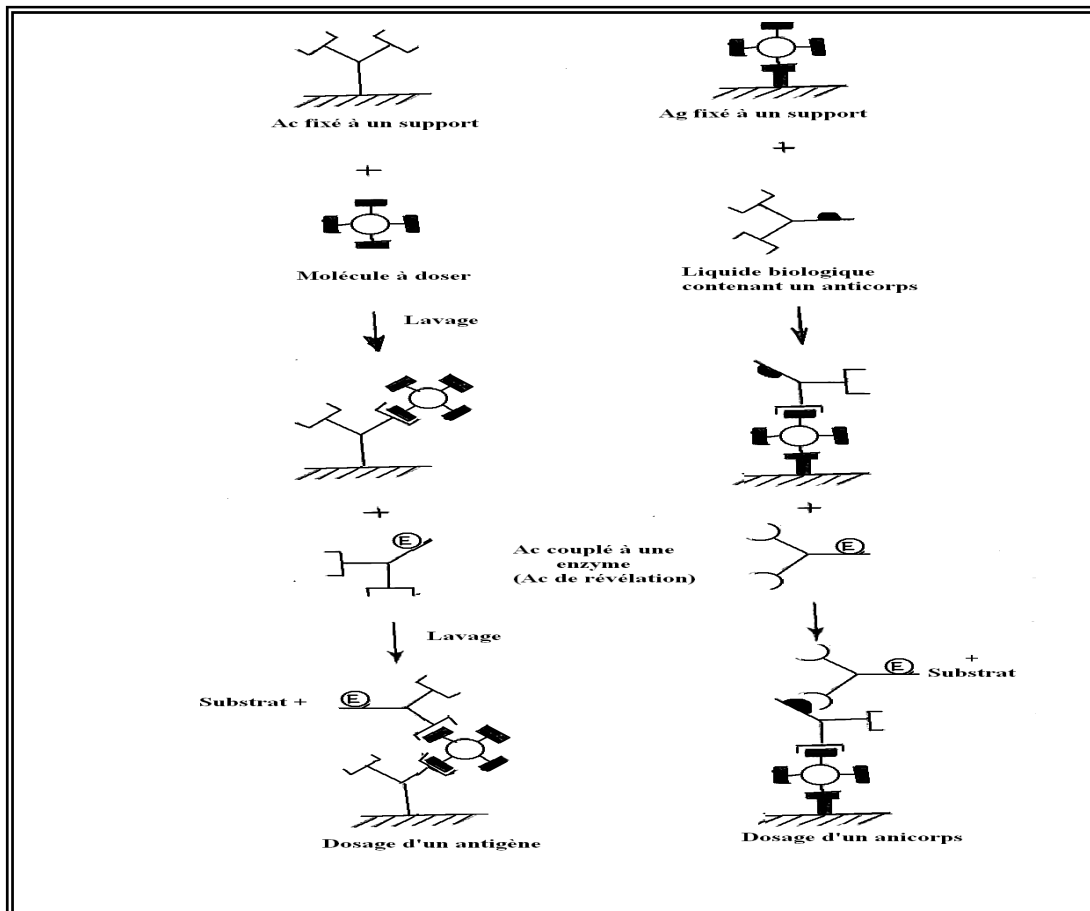


Figure 7 : Dosage immuno-enzymatique. « ELISA »
(Genetet. 2003)

III-3-3) Expansion et Clonage des hybridomes :

III-3-3-1) Expansion des hybridomes :

Les cellules des puits positifs sont transférées d'une boîte de culture d'une certaine taille à une autre plus grande, tout en éliminant progressivement l'agent sélectif du milieu de culture .

L'expansion des hybridomes est une étape souvent problématique pour la viabilité cellulaire. Cela est sans doute dû à la dilution des facteurs de croissance présents dans le milieu ainsi que dans certains cas, à une croissance trop rapide des cellules lors des étapes précédentes. Afin de contourner ce problème, un échantillon de la culture diluée est ajouté dans le puits originel.

La lourdeur de l'étape de sélection des hybridomes intéressants et de leur stabilisation est certainement le point le plus critique de la méthode. La perte des hybridomes entre l'étape de la détection d'un surnageant positif et le clonage, est en pratique très fréquente. Les cellules fusionnées sont tétraploïdes c'est-à-dire qu'elles renferment un double patrimoine génétique. Elles dépensent donc plus d'énergie dans la réplication de leur ADN. Un hybridome qui perd les chromosomes codant pour l'immunoglobuline recherchée se divisera plus vite que ses voisins et les supplantera.

De plus, un hybridome dépense tellement d'énergie dans la synthèse et la sécrétion de l'immunoglobuline, qu'il en reste d'autant moins pour sa division et sa multiplication. Il est donc "fragilisé" par rapport à une population cellulaire voisine qui risque fort de croître et de le condamner. Un clonage précoce est particulièrement recommandé si les conditions exposées précédemment sont remplies.

III-3-3-2) Clonage des hybridomes :

L'isolement d'un clone stable d'hybridomes sécrétant tous le même anticorps est l'étape la plus laborieuse de la production d'anticorps monoclonaux. Il existe deux méthodes usuelles de clonage, qualifiées de simples et rapides, et qui permettent d'obtenir des clones dérivés d'une seule cellule ; l'une se fait sur milieu liquide : clonage par dilution limite, l'autre sur milieu semi solide : clonage en milieu semi liquide.

En raison de la très faible efficacité de clonage des hybridomes, le clonage est souvent effectué en présence de cellules nourricières ou de milieu conditionné. De bonnes cellules nourricières doivent sécréter les facteurs de croissance appropriés et doivent posséder des propriétés de détersion lors de la croissance ultérieure des hybridomes. Les cultures de cellules nourricières consistent normalement en splénocytes, macrophages, thymocytes ou fibroblastes.

III-3-4) Production d'anticorps monoclonaux :

Le clonage permet de disposer d'une culture pure d'hybridome sécrétant dans le milieu l'anticorps monoclonal recherché. Le but est de faire proliférer cet hybridome dans des conditions optimales afin de soutirer du milieu de culture des quantités d'anticorps monoclonaux adaptées au but recherché.

En effet, certaines de ces applications exigent des quantités importantes d'anticorps, parfois de l'ordre de plusieurs kilogrammes. Dans le cadre du diagnostic *in vitro* : application majeure à l'heure actuelle, les tests ne nécessitent que des quantités minimales d'anticorps monoclonaux avec une exigence de pureté peu élevée (de 70% à 95%). Cependant si les tests sont très répandus, le besoin de quantités plus importantes (de l'ordre de centaines de grammes par an) se fait sentir ; comme est le cas des réactifs servant au groupage sanguin ABO ou des tests de grossesse grand public.

En immunothérapie les quantités requises en anticorps monoclonaux sont encore plus importantes, de l'ordre du kilogramme par an. Par contre, en ce qui concerne l'imagerie *in vivo* ou des tests de diagnostic *in vitro* peu répandus où très spécialisés, les besoins sont moindres, de l'ordre de quelques grammes à cent grammes par an.

III-3-5) Extraction et purification des anticorps monoclonaux :

La première étape d'extraction consiste à éliminer les cellules. Cela est facilement réalisé à grande échelle par centrifugation continue. L'ultracentrifugation à flux tangentiel permet ensuite d'obtenir un concentré contenant habituellement 1 à 5g d'anticorps par litre.

Les procédés de purification ont pour principaux objectifs de concentrer l'anticorps, d'éliminer les contaminants provenant soit du liquide ascitique soit des milieux de culture, et qui pourraient fausser les résultats ou donner des interférences dans les tests diagnostiques, ou bien encore, représenter un danger pour le malade lors de l'usage thérapeutique.

Les anticorps sont purifiés par bien des façons. Le choix de la meilleure méthode fait intervenir plusieurs paramètres : l'utilisation que l'on fera des anticorps, l'espèce dont ils proviennent, leur classe et sous-classe et la source à partir de laquelle ils seront purifiés. Bien qu'il ne soit pas possible de proposer une recette unique et universelle pour la purification d'anticorps, la méthode chromatographique se révèle souvent comme la plus simple et la plus efficace.

III- 3-6) Conservation des anticorps monoclonaux :

Un des avantages des anticorps est leur résistance à des conditions dénaturantes douces. Cela explique qu'ils puissent être conservés longtemps, relativement facilement, dans des tampons qui ne doivent pas forcément contenir des conservateurs de type glycérol.

La contamination par des bactéries ou des champignons, qui représente le risque majeur lors de la conservation des anticorps, est évitée par ajout de 0,02 % d'azide de sodium (NaN₃).

Il est possible de conserver à - 20°C les anticorps dans un sérum, un surnageant de culture ou un liquide d'ascite, selon des protocoles de congélation étudiés et établis pour ce type de protéine.

LE RADIOMARQUAGE DES PROTEINES

I) INTRODUCTION :

Depuis la découverte de la radioactivité à la fin du dix-neuvième siècle par Henri Becquerel puis de la radioactivité artificielle par Frédéric et Irène Joliot-Curie en 1933 (prix Nobel de chimie en 1935), l'utilisation des radio-isotopes n'a cessé de se développer dans différents secteurs.

Le secteur médical est le domaine le plus actif. Les composés radioactifs sont utilisés aussi bien dans le secteur de la biologie pour le dosage *in vitro* d'hormones ou de métabolites chez l'homme qu'en clinique, après administration au patient, pour un usage diagnostique et thérapeutique. Depuis les années 1980, leur application *in vivo* s'est diversifiée en relation avec le développement de nouvelles cameras et de nouveaux outils de détection plus performants, avec la mise au point de la chimie des isotopes et notamment de la chimie du technétium 99m et avec la synthèse de nouvelles molécules marquées.

Deux isotopes restent prépondérants : l'iode radioactif qui fait appel à la chimie de covalence comme tous les halogènes, et le technétium 99m qui fait appel à la chimie de coordination (ou complexation). (Apparu M.1998). Une méthode de marquage, pour être développée et utilisée au laboratoire doit être :

- simple, avec le moins d'étapes possibles, car réalisable sous une enceinte plombée. Pour une préparation en routine, le marquage doit être réalisé en une ou deux étapes.
- Rapide avec une durée en rapport avec sa demi-vie et si possible ne nécessitant pas d'étape de purification, ceci afin d'éviter une rupture de la chaîne de stérilité et de diminuer le temps de préparation.
- La pureté radiochimique doit être supérieure à 90%.

Il existe deux méthodes de marquage, que ce soit pour le technétium ou l'iode :

- la méthode directe où l'isotope est fixé directement au vecteur ;
- la méthode indirecte, utilisant un bras capable de fixer l'isotope à une extrémité et à l'autre extrémité de se lier à la molécule biologiquement active.

II) STRATEGIE DE MARQUAGE

II-1) Critères de sélection de l'isotope:

II-1-1) Le rayonnement :

Les rayonnements α et β , de faible parcours, sont utilisables exclusivement en radiothérapie métabolique. A l'inverse, les émissions γ qui traversent l'organisme jusqu'à la camera pourront être détectées. L'émission optimale pour les cameras actuelles se situe autour de 150 Kev (de 10 à 400 Kev).

II-1-2) La période physique :

Un isotope radioactif est caractérisé par sa période radioactive qui est le temps au bout duquel la radioactivité a diminué de moitié. Cette période doit être en relation avec la bio distribution de la molécule biologique (vecteur) à laquelle il est associé et donc à la demi-vie biologique du radio ligand.

La période physique doit être suffisamment longue afin que l'isotope n'ait pas perdu son activité dans le tissu sain avant que le vecteur n'ait atteint sa cible ; à l'inverse elle ne doit pas être trop longue afin de limiter l'irradiation de l'organisme et notamment des organes émonctoires.

II-1-3) L'isotope de décroissance :

La décroissance radioactive de l'élément ne doit pas, de manière générale, aboutir à la formation d'un autre élément radioactif, ceci afin de limiter les irradiations non désirées. La décroissance doit conduire à un isotope stable ou à un isotope de demi-vie longue et peu énergétique.

II-1-4) Le mode de production :

Un autre critère à prendre en compte est le mode de production et le coût qui lui est lié. Tous les isotopes utilisés en médecine nucléaire sont produits à partir de cyclotron (I^{123}), de réacteur nucléaire (I^{131}) ou de générateurs (^{99m}Tc).

II-1-5) Caractéristiques idéales d'un isotope :

- Pour une utilisation en imagerie diagnostic :

Un radionucléide doit émettre un rayonnement γ pur, afin de limiter les contraintes de radioprotection, d'une énergie comprise entre 100 et 200 Kev et sa demi-vie doit être relativement courte, compatible avec une utilisation en routine (>1 heure), comprise entre 6 et 8 heures voire 24 heures.

Les radioéléments potentiellement utilisables :

L'isotope de choix est le technétium ^{99m}Tc de par ses propriétés chimiques et physiques. Les isotopes de l'iode sont également utilisés, iode 131 (^{131}I) et 123 (^{123}I) (Tableau IV).

Tableau IV : caractéristiques des principaux radionucléides

Radionucléides	Emission	Période	Radionucléides	Emission	Période
Iode 123	γ	13,3 heures	Rhénium 186	β^- , γ	3,77 jours
Iode 131	γ , β^-	8,02 jours	Rhénium 188	β^-	16,9 heures
Technétium 99m	γ	6,02 heures	Erbium 169	β^-	9,4 jours
Indium 111	γ	67,3 heures	Lutétium 177	β^-	6,71 jours
Thallium 201	γ	3,05 jours	Carbone 11	β^+	20,4 minutes
Yttrium 90	β^-	64,1 heures	Fluor 18	β^+	108 minutes
			Iode 124	β^+ , γ	4,18 jours

II-2) STRATEGIE DU MARQUAGE A L'IODE :

Les isotopes de l'iode présentent un grand intérêt en biologie: L'iode 125 peut être utilisé en expérimentation *in vivo* chez le petit animal et *in vitro* pour les études sur culture cellulaire . (Apparu M.1998).

II-2-1) Isotopes principalement utilisés :

Les isotopes d'iode principalement utilisés en biologie sont : l'iode 125, l'iode 123, l'iode 131, et l'iode 124.

L'iode 125 :

L'iode 125 est un radionucléide de demi-vie longue (60 jours) émettant des électrons Auger et un rayonnement γ faiblement énergétique de 35 Kev. Il ne peut pas être utilisé en imagerie médicale du fait de l'atténuation des rayonnements par les tissus et des performances des cameras. Par contre, il est idéal pour la recherche où il est essentiellement employé pour la mise au point des réactions de radio marquage, l'étude des biodistributions sur les animaux et les tests *in vitro* .

L'iode 125 (NaI^{125}) est une molécule peu coûteuse, assez peu ionisante, mais suffisamment énergétique pour que le rayonnement émis soit mesurable. Son émission particulaire (électrons Auger) permet d'envisager une utilisation thérapeutique chez l'homme.

II-2-2) Les principales réactions de marquage à l'iode :

La chimie de marquage à l'iode des protéines s'est considérablement développée ces dernières années. Le choix de la réaction de marquage des peptides va dépendre de leur taille, de leurs propriétés physico-chimiques et biologiques et de la présence de groupements fonctionnels.

Différentes méthodes existent qui seront choisies en fonction de la nature des substrats, des solvants et des conditions de la réaction de marquage. On distingue les réactions par voie directe, l'iode radioactif est fixé directement sur la molécule biologiquement active par liaison covalente, et la méthode dite indirecte : le marquage est réalisé par l'intermédiaire d'un groupement prosthétique. (Guerreau D. 1998) La méthode de marquage doit répondre à plusieurs conditions:

- Les activités immunologique et biologique de la molécule vectrice doivent être conservées.
- Le marquage doit s'effectuer avec une forte activité spécifique.
- Le marquage et la purification des protéines marquées doivent s'effectuer dans des conditions aussi douces que possible.

II-2-2-1) Les réactions chimiques par voie directe :

La position de l'atome d'iode peut modifier les propriétés biologiques d'une molécule, il est donc parfois nécessaire de contrôler la réaction afin de définir la régiospécificité et la stéréospécificité de la molécule à marquer. Ces deux paramètres vont dépendre du type de réactions utilisées. Ne sera abordée dans ce manuscrit que la réaction de substitution électrophile.

Réaction de substitution :

La réaction de substitution électrophile sur un dérivé aromatique est simple à réaliser et nécessite des conditions de marquage moins dures que les autres méthodes. Cette réaction est essentielle pour le marquage des protéines et est utilisée en routine dans les laboratoires de recherche utilisant l'iode radioactif. La tyrosine réagit avec l'iode pour donner des dérivés mono ou diiodés. (Figure 8)

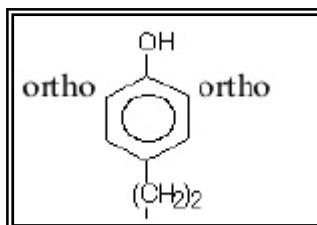


Figure 8 : Site d'halogénéation du résidu tyrosine.

Les réactions de substitutions électrophiles sont très utilisées, notamment pour le marquage de peptides, du fait de la présence de résidus tyrosine facilement marqués.

II-2-3) Les agents d'iodation :

Différents agents iodés peuvent être utilisés pour introduire l'atome d'iode radioactif sur son substrat: l'iode moléculaire (I_2), le chlorure d'iode (ICl), l'iodure de sodium (NaI), l'acide hypo iodeux (*IOH), et les composés organiques N-iodés (Iodogen®):

II-2-3-1) L'iodure de sodium (NaI):

C'est le composé le plus simple de l'iode et la seule forme commercialisée. Il est utilisé dans les réactions de substitution aliphatique nucléophile des halogénures, dans les réactions de substitution aromatique nucléophile des halogénures, dans les réactions de substitution des sels de diazonium.

II-2-4) Les agents oxydants :

L'iode étant essentiellement fourni par les producteurs sous forme NaI^* ($I^{125}I, I^{131}I, I^{123}I$), l'oxydation des ions $*I^-$ est nécessaire.

Différentes méthodes existent, elles seront choisies en fonction de la nature des substrats, des solvants et des conditions de la réaction de marquage : l'Iodobeads, l'Iodogen, le N-chlorosuccinimide, l'oxydation à la lactoperoxydase, l'oxydation électrochimique et la chloramine-T. L'oxydation par la chloramine -T est la méthode la plus couramment utilisée.

II-2-4-1) Oxydation par la chloramine-T :

L'iodation par la méthode à la chloramine-T (N-chloro-p-toluene sulfonamide) est la méthode de choix (Figure 9) pour de nombreux composés contenant des résidus tyrosyles dont les protéines (Robles KM 2001). Le radiomarquage est réalisé par substitution

électrophile aromatique par addition simple de chloramine-T et de NaI en présence du substrat puis incubation à température ambiante. La réaction est rapide (quelques minutes) et complète; elle donne un marquage avec une bonne activité spécifique (Robles A.M, 2001, Mc Conahey PJ. 1980).

La chloramine-T libère HOCl qui est l'espèce oxydante; cette dernière réagit avec l'iode radioactif présent (NaI) pour former H_2OI^+ en équilibre avec HOI et IO^- . La réaction peut s'effectuer par oxydation contrôlée, l'oxydation a lieu jusqu'à épuisement de la chloramine-T ou bien l'oxydation peut être stoppée par adjonction d'un réducteur, généralement du bisulfite de sodium ($Na_2 S_2O_5$).

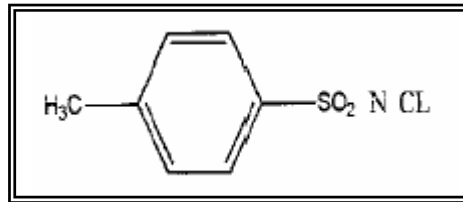


Figure 9 : Structure de la chloramine-T.

II-3) Le marquage au technétium ^{99m}Tc :

Le radionucléide technétium (^{99m}Tc) présente un intérêt primordial pour l'utilisation de molécules marquées à usage diagnostique ou thérapeutique. Le technétium est le radio-isotope le plus communément utilisé en diagnostic *in vivo*.

C'est un métal de transition, présentant des caractéristiques physicochimiques obéissantes à la chimie des complexes. En médecine nucléaire, ce radionucléide forme un complexe métallique stable, servant de traceur et, qui est lié à une molécule biologiquement active spécifique d'une fonction ou d'un récepteur. Une seule fonction ou voie biologique sera suivie. Le complexe technétié ne doit pas être métabolisé dans l'organisme.

II-3-1) Propriétés physico-chimiques et obtention du technétium :

La sélection d'un radionucléide à but diagnostique résulte d'un compromis entre ses caractéristiques nucléaires (émission γ comprise entre 100 et 200 Kev compatible avec la gamma-caméra, demi-vie courte, absence d'émission α et β) et sa disponibilité (méthode de production et coût).

Le technétium est un métal de transition artificiel découvert par Perrier et Segré en 1937. Parmi les 41 isotopes actuellement identifiés, tous radioactifs, allant de l'isotope 85 à l'isotope 115, seul le technétium ^{99m}Tc est utilisé en clinique (Du Moulinet d'Hardemare A 1998). Le technétium présente un intérêt médical pour l'analyse scintigraphique car c'est un émetteur γ pur de 140 Kev parfaitement adapté aux gamma caméras avec une demi-vie de 6,023 heures, permettant d'administrer aux patients une forte activité, avec pour conséquence de bonnes images scintigraphiques sans risque d'irradiation excessive.

Le ^{99m}Tc est obtenu à partir du molybdène par voie directe (13 %) et à partir de ^{99m}Tc (^{99}Tc) par voie indirecte (Figure 10).

Il est produit par un générateur de molybdène ($^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$) permettant l'obtention du technétium $^{99\text{m}}\text{Tc}$ quotidiennement et pour un coût limité. Ses propriétés chimiques lui permettent de former facilement des complexes organiques. (De Jonge F. 1996, Jurisson S. 1999)

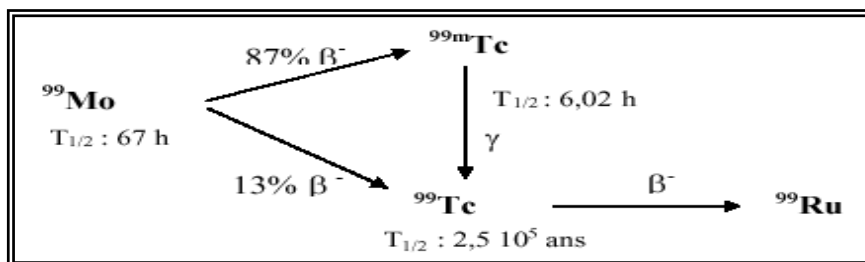


Figure 10 : Schéma de la désintégration du Molybdène 99.

En pratique, le technétium est obtenu par décroissance de molybdène-99 fixé sur une colonne d'alumine contenue dans une petite colonne de verre. L'ensemble, placé dans une protection plombée constitue le générateur $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$. Le molybdate polymérisé $[\text{Mo}_7\text{O}_{24}]^{6-}$ fortement adsorbé sur la colonne échangeuse d'ion décroît continuellement en technétium $^{99\text{m}}\text{Tc}$ et ^{99}Tc .

Cette colonne est éluée par une solution stérile de NaCl 0,9 % qui va entraîner sélectivement les ions technétium $^{99\text{m}}\text{Tc}$ et ^{99}Tc , présents sous forme de pertechnétate ($\text{Na}^{99\text{m}}\text{TcO}_4$ ou $\text{Na}^{99}\text{TcO}_4$) faiblement fixés, alors que le molybdène est retenu sur l'alumine (Jurisson S. 1999) (Figure 11).

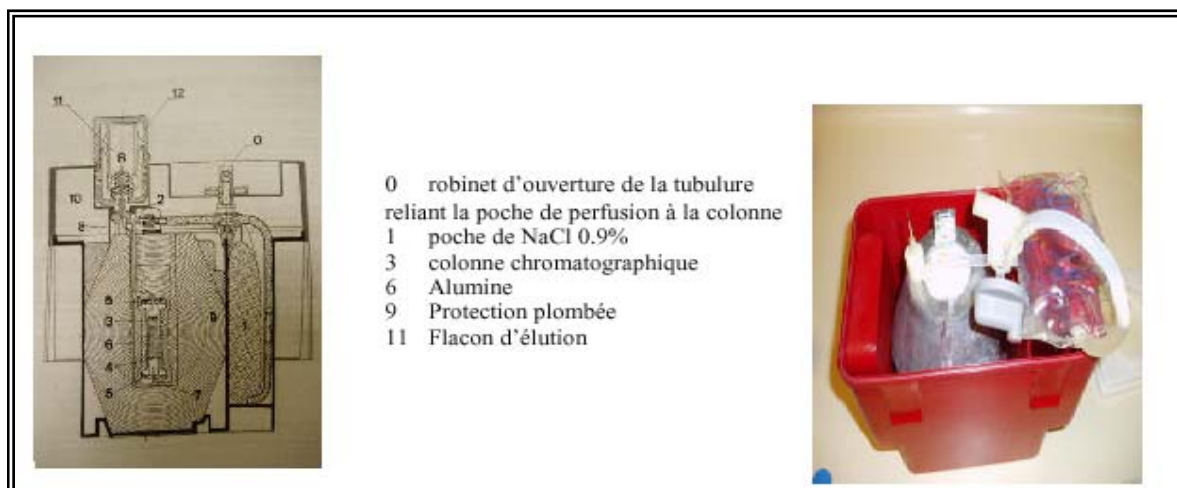


Figure 11 : Générateur $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ (Elumatic III, Schering-Cis bio International).

II-3-1-1) Chimie du technétium :

Le technétium (Tc) est un métal de la deuxième série des éléments de transition appartenant au groupe VIIB comme le manganèse et le rhénium, il possède sept électrons « s » et « d » sur la couche de valence (configuration électronique $[\text{Kr}] 4d^5 5s^2$). Comme tous les éléments de transition, sa chimie est dominée par la formation de complexe métal/ligand donneur.

Le technétium existe à différents degrés d'oxydation de (-I) à (+VII), cependant seuls les états (+I), (+III), (+V) et (+VII) sont stables en présence d'eau; les autres degrés d'oxydation ne se forment qu'en présence de ligands autres que l'eau. En solution aqueuse, à potentiel élevé et à pH physiologique, sa forme stable est l'anion TcO_4^- (+VII), seule forme commerciale (Dewannjee M. 1990, Du Moulinet d'Hardemare A. 1998).

II-3-2) Les complexes organométalliques technétiés : (Kits technétiés)

II-3-2-1) Structure générale des complexes technétiés :

Il s'agit d'un édifice polyanionique dans lequel un ion métallique est lié à plusieurs ions ou molécules par l'intermédiaire d'atomes possédant des doublets électroniques non partagés. Qu'ils soient neutres ou le plus souvent ioniques, les complexes ou kits comportent toujours une entité appelée « accepteur » qui accepte le ou les doublets électroniques (cation métallique M) et une ou plusieurs entités « donneurs » de doublets (ligands). Les donneurs d'électrons (ions ou molécules) réagissent avec les métaux ou leur ion pour donner des complexes.

II-3-2-2) La synthèse du complexe technétié : (Figure 12)

Pour pouvoir former des complexes, le technétium doit être réduit à des degrés d'oxydation inférieurs à VII, lui permettant ainsi de se lier à des ligands donneurs d'électrons. Les formes réduites du technétium doivent être complexées par le ligand dès leur formation, sinon elles réagissent avec les molécules d'eau et l'oxygène pour donner des espèces cationiques, qui évoluent en complexe de type $^{99m}TcO_2$ ou de ses formes hydroxylées. Ces derniers n'interagissent pas avec les molécules biologiques (Nowotnick D.P.1999).

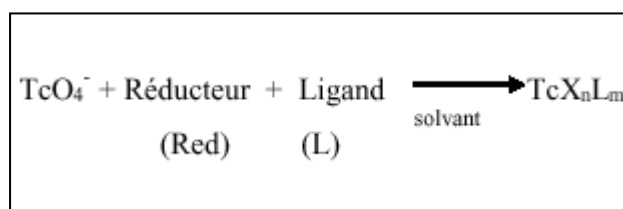


Figure 12: Réaction de complexation directe

Le solvant est généralement de l'eau si le ligand est hydrophile, ou un mélange alcool/eau. Le réducteur est fréquemment du chlorure d'étain en milieu acide ou du tartrate d'étain en milieu basique. On aboutit à la formation de $[TcO_2]^+$ ou $[TcO]^{3+}$ à l'état (+V).

II-3-2-3) Les complexes ^{99}Tc originaux (« Tc essential ») :

Ils constituent actuellement la majorité des complexes commercialisés. Les complexes de degré d'oxydation IV sont de formule générale $[TcO_2, xH_2O]$ et $[TcX_6]^{2-}$. Ils sont constitués lors des réactions de synthèse en milieu acide et en présence de traces de réducteur. Ils sont les premiers complexes à avoir été utilisés en médecine nucléaire pour les scintigraphies osseuses. Le technétium est lié généralement à des ligands alkyldiphosphonates : (MDP, HMDP..), et forme un complexe à tropisme osseux qui va se fixer aux cristaux d'hydroxyapatite de l'os en formation. Ex: MDP= $H_2PO_3-CH_2-H_2PO_3$.

MATERIEL ET METHODES

Partie I : Production d'anticorps monoclonaux : anti-Bot III par la technologie des hybridomes

A) MATERIEL

D) MATERIEL BIOLOGIQUE :

- **Anticorps polyclonal anti-Bot III :**

Cet anticorps préparé au niveau du Laboratoire de Recherche et Développement sur les Venins de l'Institut Pasteur d'Algérie, a été utilisé comme témoin positif dans le test RIA, il nous a été fourni par notre équipe.

- **Anti IgG-HRP de souris :**

L'immunoconjugué de souris, couplé à la peroxydase de marque Sigma, et utilisé dans le test ELISA simple, a été gracieusement offert par le Laboratoire de Recherche et de Développement sur les Anticorps Monoclonaux du Centre de Recherche Nucléaire de Draria.

- **Bot III-¹²⁵I :**

La toxine Bot III ayant servi au screening des surnageants de cultures cellulaires par RIA, a été radiomarquée à l'iode 125 au niveau du Département des Radio-isotopes du Centre de Recherche Nucléaire de Draria. La méthode de radioiodation est développée dans le chapitre « Méthodes ».

- **Macrophages murins :**

Ces macrophages considérés comme cellules nourricières, extraits extemporanément au laboratoire, à partir du péritoine de souris Balb/c, ont servi au maintien des cultures d'hybridomes.

- **Myélome :**

La lignée « SP2/O-Ag14 » des cellules myélomateuses, choisie comme partenaire de la fusion cellulaire, a été fournie par le Laboratoire d'Immunologie de l'Institut Pasteur d'Alger. Cette lignée est dérivée de P3 X63 Ag8, développée chez le modèle murin Balb/c, étant du caractère génotypique HGPRT⁻, Ig⁻.

- **Souris :**

Les souris femelles Balb/c (Lot de 6), âgées de six semaines et, ayant un poids moyen de $23 \pm 0,54$ g., immunisées contre la toxine Bot III, , ont été fournies par l'Institut Pasteur d'Algérie (Annexe de Kouba).

- **Toxine Bot III :**

Cette toxine purifiée à partir du venin de *Buthus occitanus tunetanus*, a été gracieusement offerte à l'équipe par le Docteur Marie-France Martin-Eauclaire. Elle a servi dans le protocole d'immunisation des souris et au screening des surnageants de cultures cellulaires par ELISA.

II) MATERIEL NON BIOLOGIQUE :

Réactifs et produits chimiques :

Les produits stériles destinés à la culture cellulaire et les produits chimiques de haute qualité analytique destinés aux tests biochimiques proviennent de différentes firmes :

EUROBIO	: Ficoll isopaque
FLUKA	: Acide acétique, Acide chlorhydrique, Acide sulfurique, Carbonate de sodium, Ethanol, Méthanol, Permanganate de potassium, Phosphate mono potassique, Phosphate bi potassique, PEG 6000.
LABOSI	: Azide de sodium.
RIEDEL DE HAIEN	: Eau oxygénée à 30%.
SIGMA	: Acide citrique, Adjuvants complet et incomplet de Freund, Bicarbonate de Sodium, Bovine Sérum Albumine, trisodique, DMEM, DMSO, γ - Globuline, Glutamine, Glycérol, Glycine, HAT, HES , O-phenylène diamine, PEG 1500, Pénicilline/Streptomycine, NaOH, Thimerosal, Pyruvate de sodium.

B) METHODES

I) PROTOCOLE ET CALENDRIER D'IMMUNISATION :

L'immunisation primaire est effectuée avec une suspension bien émulsifiée de la toxine Bot III et de l'adjuvant complet de Freund (ACF), injectée en sous-cutané, à un lot de cinq souris.

La concentration en toxine utilisée pour cette première injection est estimée au quart de la DL_{50} de Bot III, soit la quantité de $0,19\mu\text{g/souris}$, dissoute dans $200\mu\text{l}$ de volume total .

Des concentrations croissantes en toxine Bot III mélangée à l'adjuvant incomplet de Freund (AIF), cette fois-ci, sont administrées en rappels, à différents intervalles de temps, s'étalant sur deux mois, selon le calendrier adopté par Bahraoui et collaborateurs (1988). (Tableau V).

Tableau V: Calendrier d'immunisation des souris Balb/c avec Bot III par voie sous-cutanée (Selon Bahraoui *et al.*, 1988)

Jours	Quantités de Bot III par souris (µg /souris)	Dosage des anticorps
0	0,188 µg + ACF (1/4 DL50)	
8	0,374 µg + AIF (1/2 DL50)	
18	0,75 µg + AIF (DL50)	1 ^{er} dosage par ELISA et RIA, au jour J ₂₈ .
43	0,75 µg + AIF (DL50)	
45	0,75 µg + AIF (DL50)	
47	1,5 µg + AIF (2 DL50)	
4 jours avant la fusion	0,374 µg + AIF (1/2 DL50)	2 ^{eme} dosage par ELISA et RIA, au jour J ₅₇ .
3 jours avant la fusion	0,374 µg + AIF (1/2 DL50)	
2 jours avant la fusion	0,374 µg + AIF (1/2 DL50)	
1 jour avant la fusion	0,374 µg + AIF (1/2 DL50)	

II) PRELEVEMENT ET CARACTERISATION DES IMMUN-SERUMS

II-1) Prélèvement des immun-sérums:

Des saignées sont pratiquées par incision au niveau de l'une des veines caudales de l'animal. Le sang est aspiré par capillarité à travers des disques de papier Whatman, pour être immergés dans des tubes stériles contenant du tampon phosphate 0,05M pH7,4. L'antisérum est alors collecté après incubation des tubes à 37°C pendant 1 heure, puis conservé une nuit au frais. L'antisérum est ainsi prêt à être testé pour sa reconnaissance et son titre en anticorps vis-à-vis de l'antigène étudié.

II-2) Caractérisation des antisérums :

Le titre en anticorps des sérums de souris immunisées et témoin, est évalué par ELISA et RIA simples.

II-2-1) caractérisation des antisérums par RIA simple :

- **Marquage de Bot III à l'iode 125 :**

La radioiodation de Bot III servant de traceur lors du dosage radioimmunologique RIA, a été effectué *in situ*, selon la méthode d'oxydation à la chloramine-T, adaptée par Hunter (Hunter *et al.*,1970), avec un rendement de marquage de 56,6%, et une activité spécifique de 22,63 µCi/µg. La méthode de marquage à l'iode et le contrôle des traceurs sont décrits dans la *partie II* de ce chapitre.

- **Protocole de la RIA :**

Une série de dilution des antisérums, allant de 1/100 à 1/51 200, est réalisée dans le tampon phosphate 0,05 M, pH 7 contenant 0,1% de BSA et 0,01% d'azide de sodium.

Dans des tubes à essai préparés en duplicate, sont introduits successivement 100 µl de tampon phosphate, 100 µl des chaque échantillon (les dilutions des antisérums, le sérum de la souris témoin servant de contrôle négatif, l'anticorps poly clonal anti-Bot servant de contrôle positif), et 100 µl du traceur Bot III-I¹²⁵ dilué à 25 000 cpm. Les tubes sont alors incubés au bain -marie thermostaté à 37°C pendant 2 heures.

Afin de favoriser le dépôt du complexe Ag*-Ac du mélange réactionnel ; 1ml de PEG 6000 à 22%, et 100µl d'immunoglobulines murines sont ajoutés dans tous les tubes, pour être par la suite centrifugés à froid à 3000 tpm par minute.

Les surnageants sont aspirés et la radioactivité des culots est mesurée sur un compteur gamma, pendant 60 secondes. Les résultats sont exprimés en pourcentage de la liaison Ag*-Ac de chaque dilution d'antisérum ,calculé par la formule :

$$\text{Pourcentage de liaison} = \frac{(X_{(cpm)} \text{ dilutions} - X_{(cpm)} \text{ Contrôle Négatif}) \times 100}{X_{(cpm)} \text{ du traceur}}$$

Le titre en anticorps correspond à l'inverse de la dilution qui permet d'avoir 50% du pourcentage de la liaison Ag-Ac.

II-2-2) Caractérisation des antisérums par ELISA :

Dans un premier temps, une microplaque de 96 puits est sensibilisée par une solution de venin de Bot à 5 µg/ml dilué dans du tampon carbonate bicarbonate 0,1M pH 9,5 à raison de 100 µl par puits.

Après incubation d'une nuit au frais et plusieurs lavages avec le tampon PBS 0,1 M pH7,4 Tween₂₀ 0,1 %, une saturation des sites non spécifiques avec du PBS-Tween₂₀- Lait écrémé 5 % est réalisée et la microplaque est incubée à 37 °C pendant une heure.

Les antisérums sont ensuite distribués en duplicate dans les premiers puits, et une série de dilutions successives au demi, des échantillons sériques, est effectuée dans le tampon PBS-Tween₂₀-Lait écrémé 5 %. La microplaque est incubée à 37 °c pendant une heure.

Le conjugué anti IgG murin couplé à la peroxydase dilué au 1/1000^{eme} dans le tampon PBS-Tween₂₀-Lait écrémé 5 % est distribué dans tous les puits, à raison de 100 µl par puits, puis la microplaque est incubée pendant une heure à 37°C.

La réaction immunoenzymatique se développe à l'obscurité et à température ambiante pendant 15 minutes, après addition du substrat chromogène OPD (0-Phénylène Diamine dihydrochloride) et en présence d'eau oxygénée à 0,03%.

La réaction est arrêtée par addition d'une solution de H₂SO₄ 2N à raison de 50 µl par puits. L'intensité de la réaction Ag-Ac est mesurée par le lecteur d'ELISA à 490 nm . Le titre en anticorps correspond à l'inverse de la dilution qui permet d'avoir 50% de l'intensité totale de la réaction Ag-Ac.

III) HYBRIDATION CELLULAIRE

Les cinq fusions ont été réalisées selon trois protocoles :

- La première fusion a été effectuée entre cellules de myélome SP2 et les splénocytes totaux des souris immunisées. Les hybridomes ont été cultivés sans ajout de cellules nourricières.
- La seconde fusion a été réalisée entre cellules de myélomes SP2 et la population lymphocytaire extraite de la rate des souris immunisées . La culture d'hybridomes est supplémentée de cellules nourricières.
- La troisième fusion, dans laquelle les hybridomes issus de la fusion des splénocytes et myélomes sont cultivés dans un milieu de culture dépourvu de cellules nourricières.

III-1) Préparation des cellules parentales pour la fusion :

III-1-1) Préparation des cellules de myélome :

Les cellules myélomateuses sont décongelées et maintenues en culture, au moins six jours avant la fusion cellulaire. Des délais plus longs sont éventuellement nécessaires , si la viabilité des cellules décongelées s'avère non satisfaisante.

Téchnique de décongélation des myélomes :

Les cryotubes de myélomes conservés à -180°C , sont retirés du conteneur d'azote liquide et placés dans un bain-Marie réglé à 37°C jusqu'à décongélation. Les myélomes décongelés sont par la suite transférés aseptiquement sous hotte biologique dans des tubes de centrifugation stériles, contenant 20ml du milieu de culture DMEM (Dulbecco's medium) à 15% de FCS (Fetal Calf Serum), 1,25% d'antibiotiques et de Glutamine.

Après une centrifugation à 1500 tpm pendant cinq minutes, le culot est repris puis remis en suspension dans 2 ml du même milieu de culture. La concentration des cellules et le taux de viabilité sont déterminés par dénombrement au microscope inversé à contraste de phase, après coloration au bleu Trypan.

La suspension cellulaire est ensuite remise en culture dans un flacon de culture, pour être incubée à 37°C dans une atmosphère enrichie en CO_2 (5%). Les myélomes sont ainsi maintenus en culture à une concentration de 10^6 à 10^7 cellules/ml.

Les observations microscopiques quant à la morphologie des cellules, et les splitting doivent être entrepris le long de la semaine, de sorte qu'au jour de la fusion ; la densité cellulaire et le taux de viabilité des cellules soient satisfaisants pour le déroulement de l'hybridation. En effet, les cellules de myélome doivent être en phase logarithmique avec un taux de viabilité supérieur à 90%.

III-1-2) Préparation des splénocytes:

Au lendemain du dernier rappel, la souris est sacrifiée par dislocation cervicale, et la rate est extraite sous conditions stériles pour être minutieusement triturée à l'aide d'aiguilles dans le milieu de culture DMEM. Deux procédés de préparation des lymphocytes ont été développés :

- Pour la première fusion: L'extrait de rate débarrassé des agrégats cellulaires est soumis à plusieurs lavages par centrifugation à 1000 tpm pendant cinq minutes, dans le même milieu de culture.
- Pour les deuxième et troisième fusions: l'extrait de rate débarrassé des agrégats cellulaires est transféré dans un tube à centrifugation contenant 4 ml de Ficoll. Les lymphocytes sont séparés des globules rouges et du liquide de la rate par centrifugation à froid sur gradient de densité, à 1800 tpm, pendant vingt minutes.

Les lymphocytes sont alors récupérés de l'interface, et placés aussi tôt dans un flacon de centrifugation immergé dans de la glace pillée, pour être encore une fois lavés dans le même milieu de culture, par centrifugation à froid à 2500 tpm pendant 10 minutes.

Les culots, issus des deux traitements, sont repris dans 1 ml de DMEM, et testés pour la viabilité cellulaire, par la coloration au bleu Trypan. Le comptage cellulaire est effectué à l'aide d'un hématimètre.

III-2) Préparation des macrophages péritonéaux de souris:

Les macrophages péritonéaux de souris sont utilisés comme cellules nourricières (Feeder layer) pour les hybridomes issus des deuxième et troisième fusions. Leur co-culture favorise la croissance des cellules hybrides par enrichissement du milieu en facteurs de croissance, et élimination des débris cellulaires issus de la mort des myélomes et Lymphocytes non fusionnés.

Des souris Balb/c femelles, sont sacrifiées par dislocation cervicale, la veille de la fusion. Une solution de saccharose à 11,6% est injectée aseptiquement dans la cavité péritonéale des souris à raison de 5 ml . L'abdomen est ensuite massé pendant une minute afin de favoriser le lavage du péritoine.

Le liquide péritonéal est prudemment aspiré, et doit être d'apparence claire et limpide. Placé dans un flacon de centrifugation stérile immergé dans de la glace pillée, il est par la suite soumis à des lavages par centrifugation à 1000 tpm pendant cinq minutes.

Le culot est récupéré pour être resuspendu dans le milieu de culture DMEM. La densité cellulaire est déterminée par dénombrement à l'hématimètre, et une suspension de cellules nourricières au nombre de 60 000 par ml de milieu de culture DMEM est préparée pour être distribuée à raison de 50µl par puits dans des microplaques de culture contenant au préalable 100µl du milieu de culture sélectif DMEM HAT à 15% de FCS.

III-3) Fusion avec le PEG:

Les suspensions des cellules parentales sont mélangées, à raison de 10^7 cellules de myélome pour 10^8 cellules spléniques (soit un rapport myélomes : splénocytes de 1 :10). Le mélange cellulaire est alors lavé par centrifugation à 1 000 tpm pendant 10 minutes.

Le PEG concentré à 50% est ajouté goutte à goutte, à raison de 1 ml, dans 40 ml du mélange cellulaire. Une agitation douce pendant 2 minutes est recommandée à ce moment.

De la même manière, sont ajoutés 20ml du milieu DMEM à 15% de FCS, pendant 5 minutes. Le PEG est éliminé, et le mélange cellulaire est lavé par centrifugation à 1 000 tpm pendant 8 minutes, pour être incubé à 37°C dans une atmosphère enrichie en CO₂ pendant 3 heures.

Le mélange cellulaire est ensuite dilué dans 80 ml du milieu de culture sélectif DMEM, HAT, à 15% de FCS; pour être distribué, à raison de 100µl par puits, dans des plaques de microtitration contenant au préalable 100 µl du milieu de culture sélectif DMEM, HAT, HES, à 15% de FCS ou du mélange : milieu sélectif DMEM, HAT, HES, à 15% de FCS et des macrophages, respectivement pour la première et les fusions suivantes.

Les plaques de culture à 96 puits sont incubées à 37°C dans une atmosphère enrichie en CO₂, pendant 5 jours. Dès l'apparition des premières colonies de cellules hybrides, le screening des surnageants de culture est envisagé.

Après deux semaines d'incubation, le milieu sélectif est progressivement éliminé; puisque seules les cellules ayant stabilisé leur résistance au HAT, sont capable de se multiplier, grâce à l'utilisation de la voie endogène de synthèse des nucléotides ; et sont obligatoirement des hybrides :

- Au huitième jour de l'incubation, le milieu de culture est renouvelé en ajoutant 100µl du milieu frais sélectif DMEM, HES, HT, à 15% de FCS;
- Au quatorzième jour d'incubation, le milieu de culture est renouvelé par ajout de 100µl de milieu de culture frais seul sans agents sélectifs ; DMEM, HES, à 15% de FCS.

IV) SELECTION DES HYBRIDOMES PRODUCTEURS

Le screening des surnageants est effectué à partir du dixième jour d'incubation sur uniquement les puits dits positifs; c'est à dire les puits contenant les cellules hybrides repérées par observation microscopique. La détection de l'éventuelle présence d'anticorps anti-Bot III, dans les puits positifs a été effectuée par le test immuno enzymatique "ELISA simple":

Une microplaque de 96 puits est sensibilisée par une solution de venin de Bot à 5 µg/ml dilué dans du tampon carbonate bicarbonate 0,1M pH 9,5 à raison de 100 µl par puits.

Après incubation d'une nuit au frais et plusieurs lavages avec le tampon PBS 0,1 M pH7,4 Tween₂₀ 0,1 %, une saturation des sites non spécifiques avec du PBS-Tween₂₀- Lait écrémé 5 % est réalisée et la microplaque est incubée à 37 °C pendant une heure.

Les surnageants des puits contenant les cellules hybrides, sont distribués à raison de 100µl par puits. La microplaque est incubée à 37 °c pendant une heure. Le conjugué anti IgG murin couplé à la peroxydase dilué au 1/1000^{eme} dans le tampon PBS-Tween₂₀-Lait écrémé 5 % est distribué dans tous les puits, à raison de 100 µl par puits, et la microplaque est incubée pendant une heure à 37°c.

La réaction immunoenzymatique se développe à l'obscurité et à température ambiante pendant 15 minutes, après addition du substrat chromogène OPD (0-Phénylène Diamine dihydrochloride) et en présence d'eau oxygénée à 0,03%. Elle est ensuite arrêtée par addition d'une solution de H₂SO₄ 2N à raison de 50 µl par puits. L'intensité de la réaction Ag-Ac est mesurée par le lecteur d'ELISA à 490 nm .

V) EXPANSION, AMPLIFICATION ET RE-SCREENING DES CLONES POSITIFS

Les hybrides dont la production d'anticorps anti-Bot III a été confirmée par le test ELISA sont transférés des microplaques de 96 puits vers des plaques de culture de 24 puits contenant 1,5ml de milieu de culture simple DMEM HES à 15% de FCS, et ce dans le but d'une amplification.

Un second screening des surnageants est effectué à ce stade, pour repérer les clones producteurs les plus stables et les plus résistants, qui pourraient être élus pour une production intense et continue d'anticorps anti-Bot III.

VI) CONSERVATION DES MYELOMES

La masse considérable de cellules obtenues au bout d'un certain temps est particulièrement gênante mais les repiquages successifs à intervalles réguliers deviennent rapidement contraignants car les cellules sont sujettes à des contaminations diverses. (Maurin,1985) La conservation des cellules par congélation est alors conseillée, ce qui permet de satisfaire au triple objectif:

- Constitution d'une réserve cellulaire de myélomes peu encombrante bien que disponible à tout moment.
- Prévention de contamination de toutes sortes.
- Assurance du maintien des caractéristiques principales des souches entretenues.

Le mélange de congélation constitué de 40% de DMEM, 50% de FCS et 10% de DMSO est préparé, aliquoté et stocké à -20°C. Avant de prévoir une congélation, le nombre de cellules doit atteindre 5.10⁶ cellules par ml avec un pourcentage de viabilité supérieur à 90%.

Une aliquote du mélange de congélation est décongelée et déposée dans un bac à glace, dont la moitié est ajoutée goutte à goutte aux cellules en suspension sous agitation,

l'autre moitié est additionnée un peu plus rapidement. Le mélange obtenu est donc distribué dans des cryotubes destinés à être conservés à -70°C pendant une nuit. Les flacons sont ensuite transférés dans l'azote liquide à -196°C.

Partie II : Etude pharmaco toxicologique des venins d'Aah et de Bot et de leurs toxines Aah II et Bot II radiomarqués .

A) MATERIEL

I) MATERIEL BIOLOGIQUE :

- **Animaux :**

Les animaux utilisés dans cette étude proviennent de l'animalerie de l'Institut Pasteur d'Algérie (Annexe de Kouba) :

- **Souris** : L'étude de la biodistribution par dissection, a été effectuée sur souris Balb/c au poids moyen de 25 ± 1 g.
- **Rats** : L'étude de la biodistribution par imagerie scintigraphique a été effectuée sur les rats Wistar au poids moyen de 120 ± 25 g.

- **Anticorps polyclonaux anti-Bot III, anti-Bot et anti-Aah :**

Ces anticorps utilisés dans le test RIA, ont été fournis par le Laboratoire de Recherche et Développement sur les Venins de l'Institut Pasteur d'Algérie.

- **Venins et toxines :**

Le venin de *Buthus occitanus tunetanus*, et d'*Androctonus australis hector*, ainsi que leurs toxines respectives : Bot III et Aah II, ayant servi pour le radiomarquage et la biodistribution, ont été fournis par le Laboratoire de Recherche et de Développement sur les Venins de l'Institut Pasteur d'Algérie.

II) MATERIEL NON BIOLOGIQUE :

Réactifs et produits chimiques :

Tous les solvants sont obtenus auprès de Sigma Aldrich ou de Fluka, et sont de pureté chimique adaptée pour une utilisation en Chromatographie.

AMERSHAM PHARMACIA : Iodure de sodium (NaI^{125})

FLUKA : Acétone, Acide acétique, Acide chlorhydrique, Acide sulfurique, Ammoniaque 85%, Carbonate de sodium, Ethanol, Iodure de potassium, Méthanol, Phosphate monopotassique, Phosphate bipotassique, PEG 6000,

LABOSI : Azide de sodium

SIGMA : Bicarbonate de Sodium, Bovine Sérum Albumine, Bleu de Trypan , Chloramine-T, Chlorure de sodium, Gel Sephadex G25 fine, Kit standard MDP, 2-Mercaptoethanol, Metabisulfite de sodium, γ -Globuline, PEG 1500, NaOH.

B) METHODES

D) MARQUAGE DES TOXINES A L'IODE 125:

Comme spécifié précédemment, toutes les manipulations sont réalisées dans une boîte à gants plombée et ventilée en raison du risque de production de molécules d'iode radioactives et volatiles au cours des réactions d'oxydation.

Le marquage s'effectue par iodation directe d'un résidu tyrosine présent dans chaque peptide. L'iode, apporté sous forme d'iodure de sodium NaI^{125} , est oxydé selon la méthode à la chloramine-T. Le réactif oxydant transforme les ions $^{125}\text{I}^-$ en ions iodonium $^{125}\text{I}^+$. Ces derniers représentent des électrophiles puissants capables par une réaction de substitution électrophile de se fixer sur un site nucléophile (site donneur d'électrons), comme les doubles liaisons ou un noyau aromatique, et notamment en "ortho" des résidus tyrosine du peptide.

La réaction d'oxydation est stoppée par addition d'un agent réducteur qui inactive l'agent oxydant et réduit I^+ non substitué en $^{125}\text{I}^-$ (Regeczi E. 1987, Bolton A.E. 1986, Apparu M. 1998, Palmer M. 1999).

I-1) Protocole de la radioiodation des toxines :

Les conditions de la réaction sont déterminées. Nous avons cherché à optimiser la réaction en fonction de la quantité en peptides et en oxydant.

Les peptides (Bot III et Aah II) sont reconstitués chacun selon une concentration respective de 5 mg/ml et 10 mg/ml dans NaCl 0,9%, avant d'ajouter 10 μl de tampon de phosphate à 0,25 M et pH 7,4.

Le radiomarquage est réalisé à l'aide de 5 μl d'iodure de sodium (NaI^{125}) ayant une activité spécifique de 400 $\mu\text{Ci/ml}$ (14,8 MBq). L'oxydation de l'iode se fait par la chloramine T, à des concentrations décroissantes de 0,2 mg/ml et 0,5 mg/ml.

La substitution électrophile du résidu tyrosine par l'iode nécessite un temps réactionnel de 60 secondes, la réaction est ensuite stoppée par addition de 10 μl de metabisulfite de sodium et de 100 μl d'iodure de potassium aux concentrations respectives de 0,2 mg/ml, et 10 mg/ml.

I-2) Purification des toxines radiomarquées :

La purification des protéines radiomarquées a été réalisée par chromatographie sur Sephadex G25. La radioactivité des éluats de 1 ml est mesurée à l'aide d'un compteur gamma (Cobra Packard) pendant une minute, permettant ainsi d'établir le profil d'éluion du radio traceur. Le rendement de marquage est alors calculé selon la formule :

$$\text{Rendement (\%)} = \frac{\text{Radio activité associée à la protéine (cpm)}}{\text{Radio activité totale (cpm) associée à la protéine et à l'iodure}} \times 100$$

Des aliquotes de 200µl de la protéine marquées sont conservées à -20°C dans des cryotubes à des concentrations avoisinant la dose sublétales de chaque toxine, soit 0,3µg par souris et 0,1µg par souris pour Bot III et Aah II respectivement. Les aliquotes correspondants aux pics de radioactivité sont contrôlés par Chromatographie sur couche mince.

II) MARQUAGE DES PROTEINES AU TECHNETIUM 99m :

Le technétium 99m est l'isotope de référence en biologie de par sa facilité d'obtention et son coût de production. Le choix de tester un marquage au technétium 99m s'est imposé. Depuis quelques années, de nombreux peptides marqués au technétium 99m ont été développés pour l'imagerie .

Le marquage des venins au technétium 99m, à été réalisé avec un petit synthon, en cours de validation, fabriqué *in situ* , sous forme de kit MDP (figure 13), au Laboratoire des Radioisotopes du Centre de Recherche Nucléaire de Draria. Le kit Medronate (MDP) est une trousse constituée d'un mélange d'acide médronique (20 mg), acide ascorbique (1 mg), et de fluorure d'étain (SnF₂ 0,38 mg). Le pH est préalablement ajusté à 6,5 avec de NaOH ou HCl.

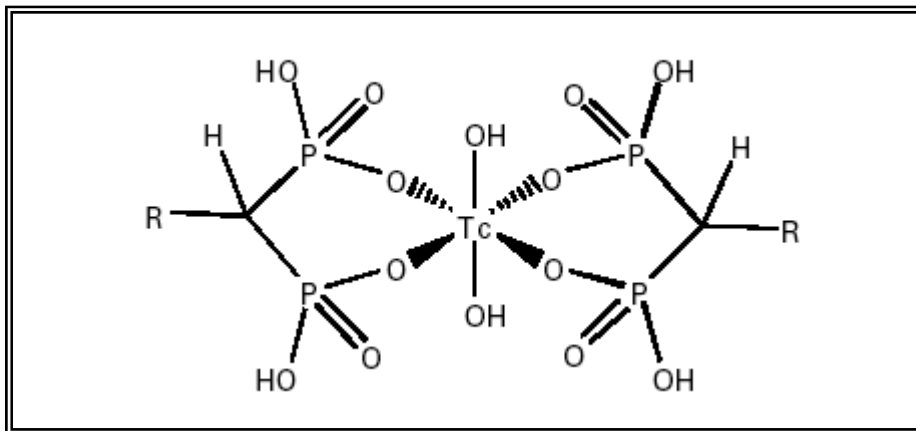


Figure 13: Kits technétiés.

MDP-^{99m}Tc (R=H)

HMDP-^{99m}Tc (R=OH)

La méthode de marquage direct des peptides réduits au technétium 99m et au MDP a été développée par Schwarz et Mather (Schwarz et al.1987, et Mather et al.1990). Elle est considérée comme la procédure de référence pour son rendement de marquage et pour stabilité des protéines marquées.

II-1) Protocole de marquage des protéines au technétium 99m:

Le marquage est réalisé en trois étapes :

- Réduction des ponts désulfures au 2-mercaptoethanol avec un rapport molaire de 1000 :1. La protéine est reconstituée dans une solution saline de NaCl 0,9 % à une concentration de 10mg/ml. A une aliquote de 100µl de la protéine, sont ajoutés 7,4µl d'une solution pure de 2-mercaptoethanol, le mélange réactionnel est mis à incuber pendant 30 minutes à 20°C.
- Purification de la protéine réduite par chromatographie Sephadex G25, utilisant un tampon phosphate 0,5M, pH7,4 pour l'élution. La lecture de l'absorbance est effectuée à 280nm. Les fractions contenant des concentrations en protéines supérieures à 0,5 mg/ml sont rassemblées et stockées à -70°C. La conservation se fait dans des cryotubes contenant chacun 250µl de la protéine réduite à des concentrations avoisinant les doses sublétales des venins, soit 15µg par souris et 7,5 µg par souris pour les venins Bot et Aah respectivement.
- Mise en contact du kit standard MDP, reconstitué dans une solution saline, et la protéine, avec un rapport volumique de 1:1,5. Le pertechnétate de sodium ajouté au complexe protéine-MDP, sous agitation douce. La réaction est complétée par incubation du mélange réactionnel à température ambiante pendant 10 minutes.

III) CONTROLE DE QUALITE DES TRACEURS PEPTIDIQUES :

Les traceurs préparés sont évalués selon leur pureté radio chimique ; rendement de marquage ; activités spécifique et volumique.

III-1) Contrôle de la pureté radiochimique :

Pour un radionucléide donné, c'est le rapport en pourcentage de la radioactivité attribuable à la forme chimique indiquée, à la radioactivité totale attribuable à ce radionucléide dans la préparation radio pharmaceutique. Elle est évaluée en mesurant le pourcentage d'impuretés radioactives. La détermination de la pureté radiochimique des traceurs peptidiques est réalisée par Chromatographie Ascendante sur papier de silice ITLC-SG .

- Chromatographie Ascendante sur Couche Mince :

Pour chaque traceur peptidique, différents solvants sont testés, et choisis selon la résolution de séparation des molécules d'intérêt du radioélément libre utilisé : NaCl 0,9%, acétone, méthyle-éthyle-cétone mélange binaire méthanol/eau (85/15), mélange tertiaire éthanol/ammoniaque/eau (2/1/5).

Le mélange binaire méthanol/eau a été utilisé pour la séparation des traceurs iodés ; où l'excès d'¹²⁵I est retenu au point de dépôt des bandes chromatographiques. L'acétone, tout comme le méthyle-éthyle-cétone permettent la révélation de l'éventuelle existence du technétium sous sa forme oxydée TcO_4^- , qui migre au front du solvant ($R_f : 1$), alors que la protéine technétée reste au point de dépôt ($R_f : 0$).

La forme réduite colloïdale du technétium TcO_2 , quant à elle, est révélée par le mélange tertiaire éthanol/ammoniaque/eau et la solution saline à 0,9% de NaCl, et est retenue au point de dépôt ($R_f : 0$).

Le développement s'effectue sur le papier ITLC-SG, conçu spécialement pour ce type de chromatographie. Une fois le front atteint, les bandes de la phase stationnaire sont séchées pour être soit directement placées dans le radiochromatographe, ou insérées, découpées en bandelettes de 0,5 cm, dans les puits de mesure du compteur gamma.

La pureté radiochimique (PRC) est évaluée en mesurant, à partir du chromatogramme obtenu, le pourcentage d'impuretés radioactives selon la formule suivante :

$$\text{PRC (\%)} = (\text{Activité de la molécule marquée} / \text{Activité de toutes les espèces chimiques présentes}) \times 100$$

III-2) Activité spécifique :

L'activité spécifique traduit la proportion des molécules marquées par rapport à l'ensemble des molécules. Elle est exprimée en unité d'activité (μCi) par unité de masse (μg) ou moles.

L'activité spécifique dépend de la concentration des réactifs utilisés et du rendement de marquage. Elle est calculée par la formule suivante :

$$\text{AS } (\mu\text{Ci}/\mu\text{g}) = (\text{Taux d'incorporation du radio élément} \times \text{Radioactivité totale}) / \text{Masse de substance } (\mu\text{g})$$

III-3) Activité volumique :

L'activité volumique est exprimée en unité de radioactivité par unité de volume ($\mu\text{Ci}/\text{ml}$). Elle est calculée selon la formule suivante:

$$\text{AV } (\mu\text{Ci}/\text{ml}) = \frac{\text{Radioactivité du pic}_{(\text{cpm}/\text{ml})}}{3,7 \cdot 10^4 \times \text{Efficacité du Compteur}}$$

III-4) Immuno-réactivité :

La capacité de reconnaissance et de liaison de la molécule marquée à son anticorps spécifique est vérifiée par RIA. Elle permet de vérifier l'intégrité structurale des peptides radiomarqués.

III-5) Stabilité des traceurs peptidiques :

La stabilité des venins et toxines radiomarqués, se fait par le contrôle de la pureté radiochimique et de l'immunoréactivité en fonction du temps ; pendant 24 heures . Le peptide radiomarqué est dilué dans 1 ml de sang frais murin et incubé à 37°C sous agitation afin de reproduire au mieux les conditions *in vivo*.

La PRC permet d'apprécier la décomplexation du traceur en fonction du temps, elle est déterminée avant, pendant et après incubation par ITLC-SG. Les échantillons de sang sont analysés directement sur ITLC, avec élution par l'acétone ou NaCl 0,9%, et lecture au radiochromatographe.

IV) ETUDE DE LA BIODISTRIBUTION DES PROTEINES RADIOMARQUEES :

L'étude de la biodistribution par prélèvements d'organes est réalisée pour l'ensemble des traceurs sur des souris Balb/c et, l'analyse des images scintigraphiques, ne concernant que les venins marqués au technétium 99m, a été effectuée sur les rats Wistar.

Après vérification de la pureté radiochimique des venins et toxines radiomarqués, les préparations sont injectées aux animaux, à une dose sublétale, tant par voie sous-cutanée que par voie intraveineuse. Les molécules iodées sont injectées à raison de 200 µCi par souris et les peptides technétiés à raison de 250 µCi par souris :

Trois lots de souris (n=3) sont envenimés, par voie sous-cutanée avec une dose sublétale des toxines radioiodées Aah II et Bot III. Un lot de souris témoins (n=3) a reçu la même dose en radioactivité d'iode 125 seul.

Quatre lots de souris (n=3) sont envenimés par voie sous-cutanée avec une dose sublétale des venins technétiés d'Aah et de Bot. Un lot de souris témoins (n=3) a reçu la même dose en radioactivité du kit MDP-^{99m}Tc par la voie sous-cutanée.

Six lots de souris (n=3) envenimés par voie intraveineuse, avec des doses sublétales des venins technétiés d'Aah et de Bot. Trois autres souris ont servi de témoins et ont reçu la même dose en radioactivité du kit MDP-^{99m}Tc, par la même voie d'injection.

L'expérience a été complétée par une étude de la biodistribution, sur gamma caméra. Pour cela, douze rats Wistar envenimés par voie intraveineuse avec les venins technétiés d'Aah et de Bot, ont été utilisés pour l'imagerie scintigraphique. Les rats sont euthanasiés par des vapeurs d'éther, puis placés sous la caméra. Des images sont réalisées après un temps d'acquisition de 5 minutes, 15 minutes, 30 minutes, 60 minutes, 180 minutes et 1440 minutes après l'envenimation.

Les souris sont sacrifiées par dislocation cervicale après 5 minutes, 30 minutes, 60 minutes, 180 minutes et 1440 minutes après l'envenimation. Des échantillons des principaux tissus et organes (Sang, foie, reins, rate, poumons, estomac, intestins, peau, os, cœur, site d'injection) ont été prélevés, pesés et mesurés au compteur gamma pour l'étude de la biodistribution du traceur.

La mesure de la radioactivité a été effectuée sur différents instruments : la mesure des échantillons liquides et solides est réalisée soit sur activimètre (pour les activités supérieures à 37 KBq) soit sur passeur d'échantillon compteur gamma (pour les activités inférieures à 37 KBq). Les scintigraphies petit animal (souris, rats) sont réalisées sur une gamma-caméra.

RESULTATS ET DISCUSSION

Partie I : Production d'anticorps monoclonaux : anti-Bot III par la technologie des hybridomes

I) DETERMINATION DES TITRES EN ANTICORPS DES IMMUN-SERUMS

Les titres en anticorps des antisérums des souris immunisées et témoin, ont été déterminés par ELISA et RIA simples, dix jours après les troisième et sixième injections sous-cutanée de l'antigène. Ne seront illustrés dans ce manuscrit que les résultats de la sixième injection .

Les résultats des titres en anticorps anti-Bot III, des sérums de souris témoin et immunisées, sont présentés dans le tableau VI pour le test ELISA simple et, dans le tableau VII pour le test RIA simple. Ils sont exprimés en absorbance pour le test ELISA et, en pourcentage de liaison pour le test RIA .

Les titres en anticorps sont extrapolés des graphiques tracés (Figures 14 et 15), et sont considérés comme la valeur du titre qui correspond à 50 % d'absorbance maximale pour le test ELISA simple et, à 50 % de liaison pour le test RIA simple .

Les résultats montrent que les antisérums des souris immunisées 3 et 5, présentent le titre en anticorps le plus élevé, soit respectivement 11 900 et 12 675 pour le test ELISA et 12 600 et 12 050 pour le test RIA.

Les titres en anticorps des antisérums déterminés par les deux méthodes indiquées, sont comparables .

II) PREPARATION DES CELLULES PARENTALES POUR LA FUSION

II-1) Cellules de myélome :

Un lot de cellules de myélome SP2 est décongelé, une semaine avant la fusion, et est maintenu en culture. Une prolifération cellulaire exponentielle des cultures de myélomes est observée sur une période d'une semaine. Le métabolisme intense et accéléré de ces cellules a nécessité des « spléeting » cellulaires avec renouvellement fréquent du milieu nutritif. Le pourcentage de viabilité étant supérieur à 90%, avec une intensité cellulaire variant de 10^7 à 10^8 cellules par ml , les fusions ont pu être programmées de suite (Figure 16).

II-2) Cellules spléniques :

Les splénocytes sont isolées et lavées plusieurs fois avec le DMEM. Leur intensité cellulaire déterminée à l'aide du bleu Trypan est supérieure à 10^8 cellules par ml. La séparation de la population lymphocytaire par le Ficoll, a permis l'obtention d'une concentration cellulaire moyenne en lymphocytes de $0,81.10^7$ cellules par ml.

Tableau VI : Titres en anticorps des sérums de souris témoin et immunisées contre Bot III, déterminés par ELISA, après la 6^{ème} injection .

Titres	DO des antisérums de souris					
	Souris 1	Souris 2	Souris 3	Souris 4	Souris 5	Témoin
400	0,604	0,557	0,647	0,568	0,688	0,235
800	0,588	0,538	0,504	0,427	0,576	0,105
1600	0,517	0,420	0,459	0,389	0,497	0,082
3200	0,399	0,314	0,469	0,306	0,441	0,05
6400	0,302	0,278	0,375	0,284	0,399	0,036
12 800	0,185	0,118	0,323	0,134	0,356	0,046
25 600	0,092	0,075	0,188	0,099	0,253	0,023
51 200	0	0	0,078	0	0,122	0,012
Titres (à 50% d'absorbance)	5 200	4 900	11 900	4 800	12 675	/

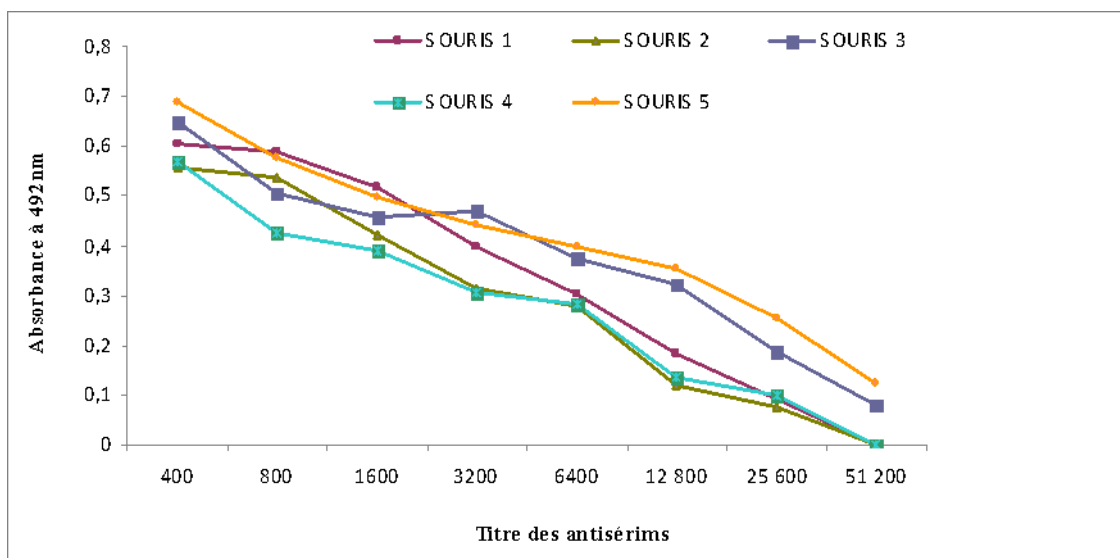


Figure 14 : Détermination par ELISA des titres en anticorps des immun-sérums des souris immunisées contre Bot III, après la 6^{ème} injection.

Tableau VII : Titres en anticorps des sérums de souris témoin et immunisées contre Bot III, déterminés par RIA, après la 6^{ème} injection

Titres	Pourcentage de liaison des antisérums de souris					
	Souris 1	Souris 2	Souris 3	Souris 4	Souris 5	Témoin
400	88,65	99,65	98,31	87,65	96,5	0
800	79,65	90,24	81,26	71,22	90,32	0
1600	66,32	85,65	75,41	62,55	85,23	0
3200	54,2	70,31	70,36	56,31	71,87	0
6400	46,2	59,21	64,32	45,26	55,28	0
12 800	39,27	48,62	50,97	37,87	46,32	0
25 600	26,31	41,32	40,21	24,64	21,64	0
51 200	15,69	36,51	36,97	19,86	12,43	0
Titres (à 50% de liaison)	5 300	5 100	12 600	5 600	12 050	/

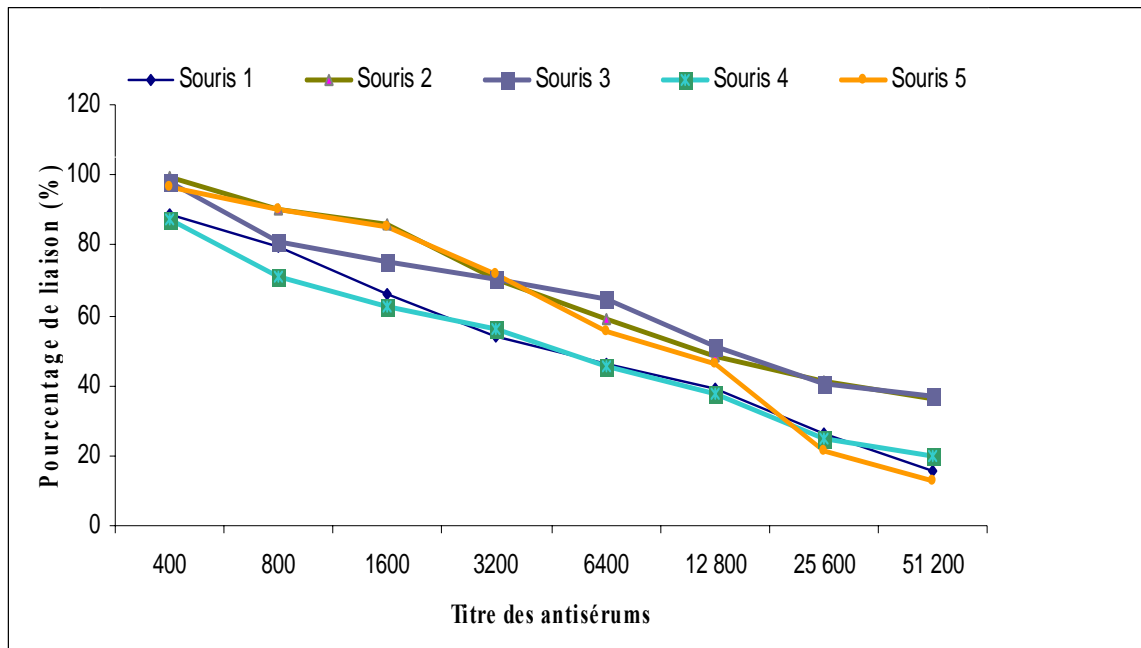


Figure 15 : Détermination par RIA des titres en anticorps des immun-sérums des souris immunisées contre Bot III, après la 6^{ème} injection.

III) FUSION CELLULAIRE :

Au total, cinq fusions ont été réalisées avec deux procédés différents, en présence ou en absence de cellules nourricières murines ; l'un utilisant la totalité des cellules spléniques, comme partenaire de fusion, l'autre interpelle spécifiquement la population lymphocytaire.

Les cellules hybrides issues de la fusion, observées au onzième jour de l'hybridation cellulaire, indiquent une prolifération cellulaire importante et un aspect morphologique caractéristique des hybridomes (Figure 17).

III-1) Rendement des fusions cellulaires :

Les rendements des hybridations cellulaires, réalisées par les deux procédés cités sont rapportés dans le tableau VIII. Ils représentent le rapport des puits considérés positifs sur le nombre total des puitsensemencés, aussi bien en présence qu'en absence de macrophages péritonéaux murins.

Les résultats des rendements révèlent le rôle positif qu'ont apporté les macrophages à la croissance des cultures d'hybridomes, en plus du HES, un supplément nutritif riche en cytokines et facteurs de croissance.

En effet les macrophages murins, en plus de leur rôle dans la détersion du microenvironnement, représentent une source permanente de cytokines et facteurs de croissance indispensables à la multiplication et à la prolifération des cultures d'hybridomes.

La séparation de la population lymphocytaire, à partir des splénocytes totaux, apporte un meilleur rendement quant à l'expansion des cultures d'hybridomes, en augmentant les probabilités d'obtention d'hybrides issus de parents myélomateux et lymphatique.

III-2) Screening et amplification des hybridomes sécréteurs :

La sélection des clones producteurs d'anticorps spécifiques dirigés contre la toxine Bot III, a été réalisée à partir du onzième jour de la fusion, par ELISA simple, avant et après expansion et amplification des clones.

Les résultats obtenus révèlent des pourcentages satisfaisants quant à la production d'hybridomes sécréteurs d'anticorps dirigés contre Bot III. Les meilleurs rendements sont ceux obtenus en présence de macrophages dans les cultures d'hybridomes issus de la fusion des myélomes et de la population lymphocytaire isolée. (Tableau VIII)

Après expansions et amplifications des hybridomes, seuls les clones 2G7, 3B2 et 2D6, 3C9 issus respectivement de la troisième et quatrième fusion, ont été qualifiés de stables, pour leur résistance aux différentes étapes de culture. Les résultats obtenus indiquent que la technique de fusion appliquée, dans ce travail de thèse, est efficace.

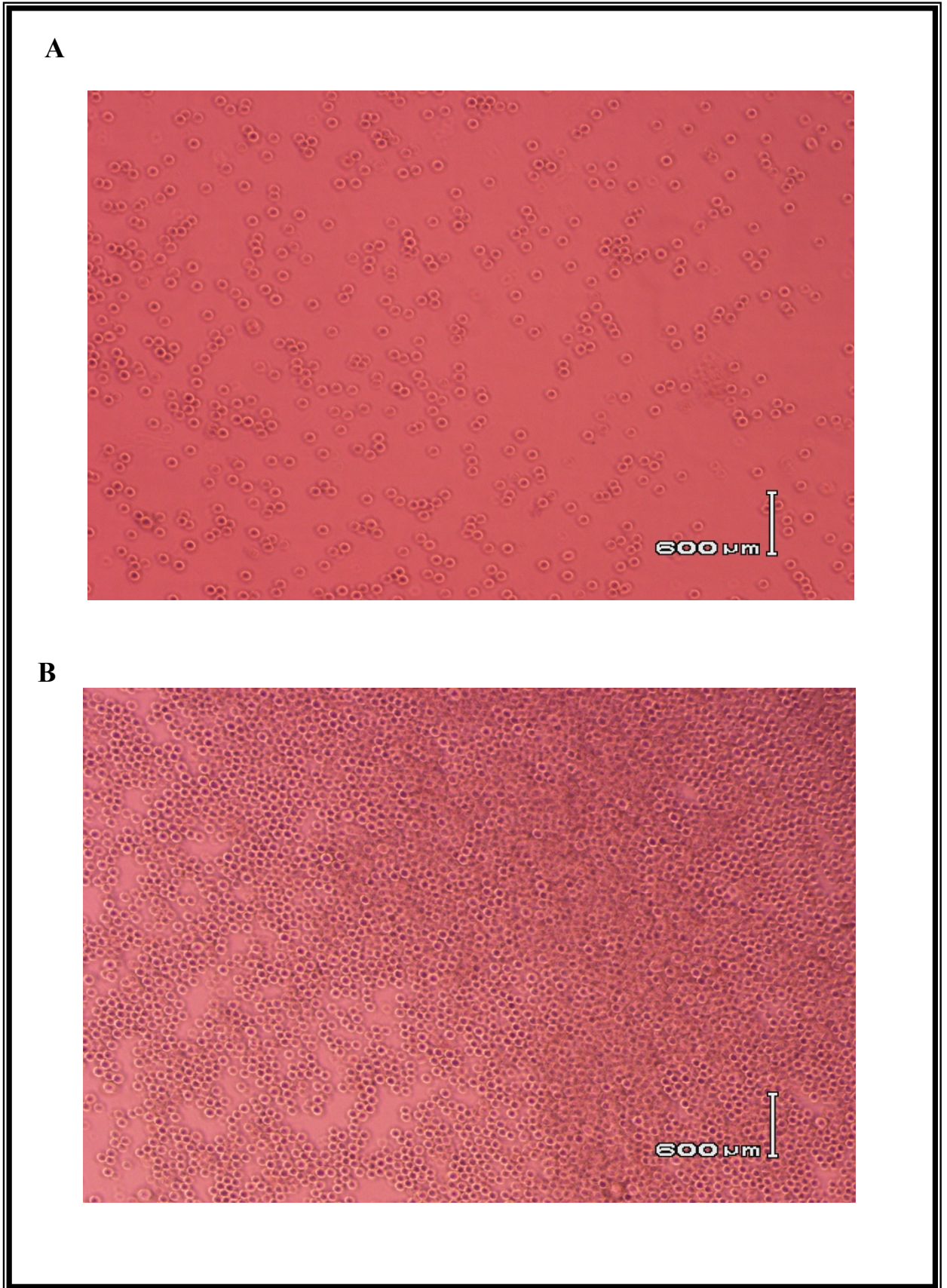


Figure 16 : Observations au microscope inversé ; des cellules de myélomes SP2 en culture dans le DMEM, après décongélation (A), et après 48 heures de croissance (B), au grossissement G10x10.

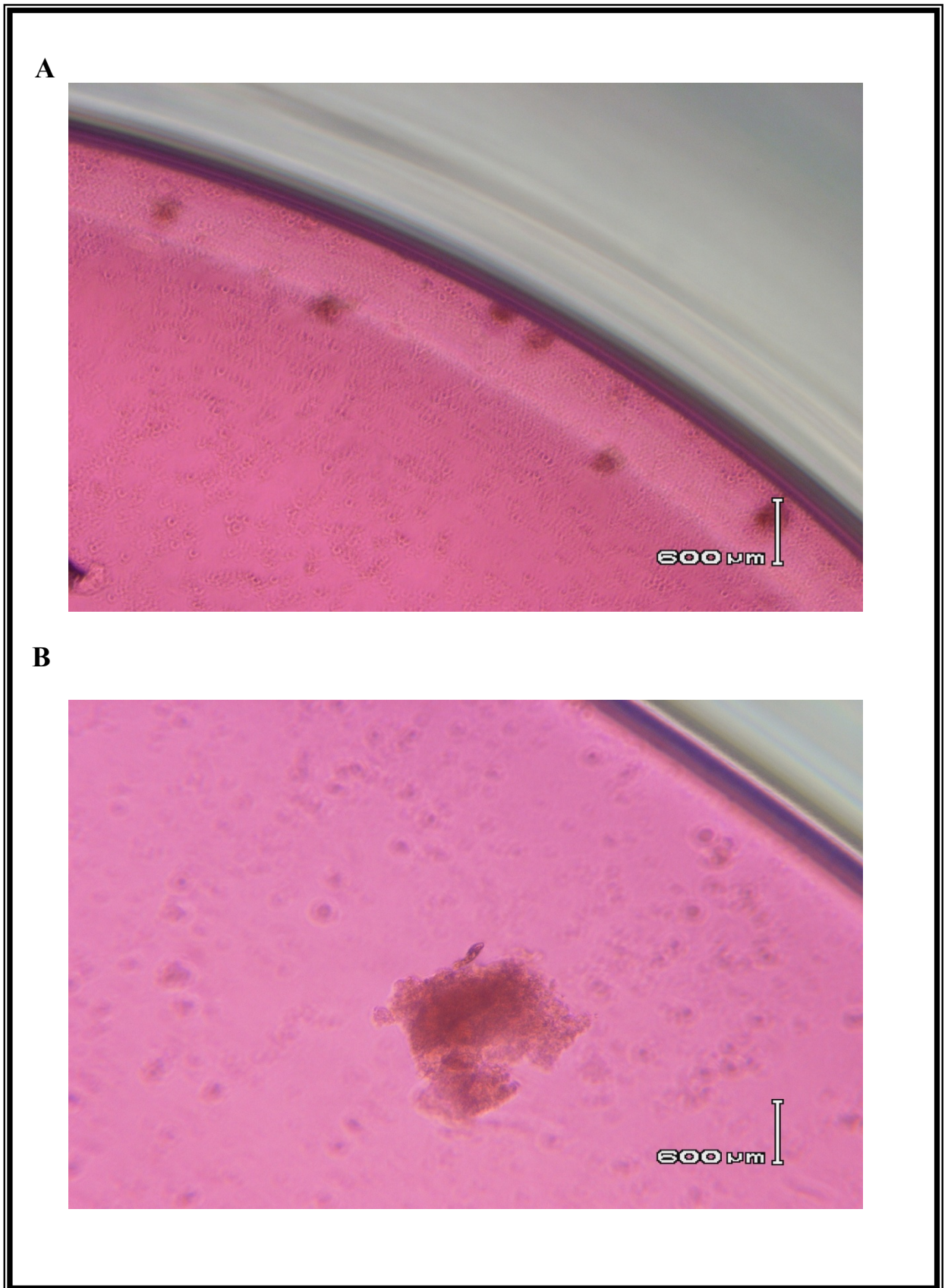


Figure 17 : Observation microscopique des hybridomes, onze jours après la fusion cellulaire, aux grossissements G10x4 (A), et G10x10 (B).

Cependant une baisse progressive du pouvoir sécrétoire d'anticorps des clones hybrides stables, est observée au cours des étapes d'expansion et de clonage.

Ceci pourrait être expliqué sur le plan génétique : soit par la lenteur de croissance des cellules hybrides, influençant négativement sur leur fonction sécrétrice ; ou par la grande instabilité chromosomique , de leur matériel génétique, qui pourrait conduire à la perte d'une partie des gènes contenant les loci , codant pour les chaînes légères et lourdes des anticorps (Theillaud ; 2005).

Sur le plan biochimique, la diminution du pouvoir sécrétoire des hybridomes pourrait être due à la faible affinité des anticorps sécrétés, se traduisant par la faible détection par les tests biochimiques (Bazin ; 1985).

Tableau VIII : Rendements des différentes fusions réalisées.

Numéros de fusion	Fusion Avec /sans Ficoll	Culture des hybridomes avec / sans macrophages	Densité en Myélomes SP2	Densité en splénocytes	Rendements des fusions (%)	Clones positifs (%)	Clones stables (%)
1	-	+	$4,8 \cdot 10^7$	10^8	36	20, 34	0
2	-	-	$5 \cdot 10^7$	10^8	25	16,64	0
3	+	+	$5,6 \cdot 10^7$	$0,28 \cdot 10^7$	60	45,81	2G7, 3B2
4	+	+	$4,2 \cdot 10^7$	$1,34 \cdot 10^7$	58	39,5	2D6, 3C9
5	-	+	$5,1 \cdot 10^7$	10^8	38	18,21	0

Partie II : Etude pharmaco toxicologique des venins d' Aah et de Bot et de leurs toxines Aah II et Bot III radio marqués

I) PREPARATION DES PROTEINES MARQUEES :

I-1) Marquage à l'iode 125 et contrôle de qualité des toxines marquées :

I-1-1) Marquage des toxines à l'iode 125 :

I-1-1-1) Paramètres de la réaction de marquage :

Les concentrations en peptides retenues pour le marquage sont celles où les PRC (puretés radiochimiques) sont supérieures à 90%. Soit, les concentrations de 10 µg pour Bot III et de 5 µg pour Aah II.

La cinétique de la réaction de marquage dépend du temps de la réaction et de la concentration en chloramine-T ajoutée à la solution. Ainsi, avec un temps d'incubation de 60 secondes, et à une concentration de 0,2 mg/ml en chloramine-T; le chromatogramme ne montre aucune dégradation des toxines. Une dégradation de la protéine a été, par contre, observée à une concentration en chloramine-T de 0,5mg/ml, suite à son action oxydante.

I-1-2) Contrôle de qualité des toxines marquées :

I-1-2-1) Evaluation des toxines iodées :

Les toxines marquées ont été évaluées par rapport au rendement de marquage, aux activités volumique et spécifique et à la pureté radiochimique.

La purification des traceurs par chromatographie sur Sephadex G-25, a permis d'établir des profils d'élution exprimés en radioactivité (cpm) pour chaque fraction éluee. Ces profils révèlent la présence de deux pics l'un correspondant à la toxine marquée, l'autre à l'iodure libre ^{125}I . La toxine radiomarquée Bot III- ^{125}I est éluee entre les fractions 10 et 15, et l'iodure libre est élué entre les fractions 25 et 29. La toxine marquée Aah II- ^{125}I est éluee entre les fractions 13 et 15, et l'iodure libre est élué entre les fractions 26 et 27.

Dans le but d'obtenir un traceur le plus pur possible, les fractions présentant les plus hautes activités de l'éluat de Bot III- ^{125}I , et d'Aah II- ^{125}I ont été rassemblées. Il s'agit des fractions 11, 12, et 13, pour la toxine Bot III et les fractions 13, 14, et 15, pour la toxine Aah II (Figure 18).

Les paramètres de marquage des toxines ont été déterminés, à partir des profils chromatographiques d'exclusion moléculaire, et sont rapportés dans le tableau IX.

Tableau IX : Paramètres de marquage à l'iode 125 des toxines Bot III et Aah II

Paramètres de marquage	Bot III-I ¹²⁵	Aah II-I ¹²⁵	Normes de la Pharmacopée Européenne
Rendement de marquage (%)	56,59	85,4	>70 %
Activité spécifique (μCi/μg)	22,63	34,16	/
Activité volumique (μCi/ml)	2,76	12,42	/
Puretés radiochimiques (%)	91,75	95,40	>90 %

I-1-2-2) Contrôle de la pureté radiochimique des traceurs :

La pureté radiochimique est déterminée par chromatographie ascendante sur papier ITLC-SG, où l'élution a été effectuée avec le mélange binaire approprié composé de méthanol/eau (85/15) (v/v). La radioactivité mesurée sur le compteur gamma, est exprimée en cpm.

Selon les indications décrites dans la monographie de la Pharmacopée Européenne des radiopharmaceutiques ; la chromatographie sur couche mince, développée avec le solvant binaire méthanol/eau (85/15, v/v), permet de séparer la molécule marquée, qui migre au front du solvant, des impuretés qui, quant à elles, restent au point de dépôt des échantillons.

Les radiochromatogrammes obtenus, révèlent bien la présence d'un seul pic, caractéristique des toxines marquées, ayant migré au front du solvant. Les puretés radiochimiques de Bot III-¹²⁵I et d'Aah II-¹²⁵I calculées sont en parfaite concordance avec les normes de la Pharmacopée Européenne et sont respectivement de 91,75 % et 95,40%. (Figure 19)

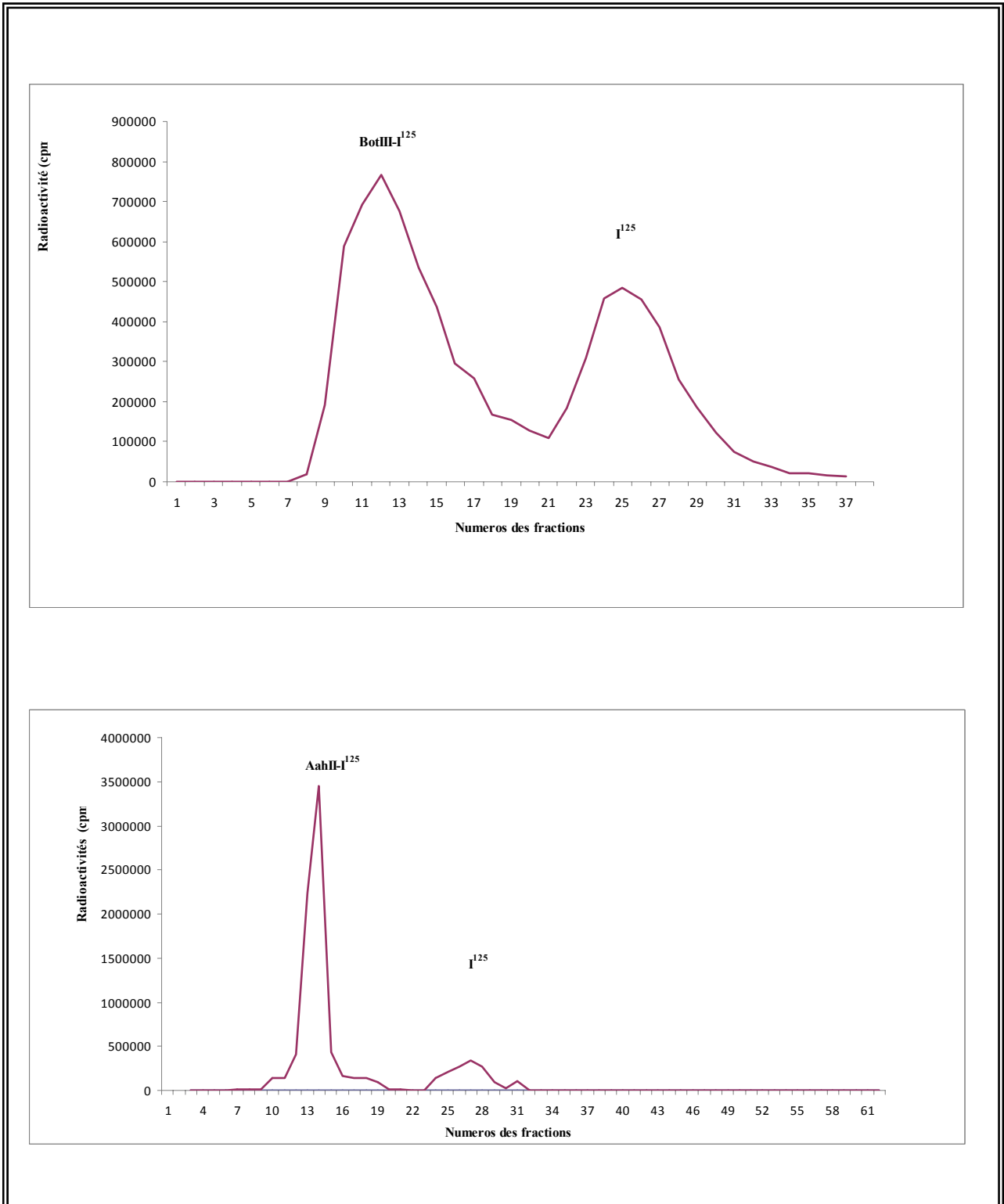


Figure 18: Profils Chromatographiques d'exclusion moléculaire sur gel de sephadex G25, du mélange réactionnel de la radioiodation des toxines Bot III et Aah II. (Elution par le tampon phosphate 0,05M, pH 7,4)

I-1-3) Immuno-réactivité :

Les conditions de marquage (oxydation) peuvent conduire à des modifications structurales secondaires, et tertiaires de la protéine, avec des phénomènes d'agrégation et une perte de l'immuno-réactivité. Le recours au test RIA simple est obligatoire, pour la révélation d'éventuelles altérations de la protéine marquée.

Un pourcentage de liaison supérieur ou égal à 30%, reflète bien une reconnaissance puis une liaison de l'antigène à son anticorps spécifique. (Harlow, 1988)

Les résultats du test RIA appliqué aux protéines marquées pures et diluées, affirment bien leur intégrité structurale. (Tableau X)

Tableau X : Etude de l'immuno-réactivité des toxines radiomarquées, évaluée par RIA.

Echantillons	Dilutions	Contrôle négatif	Bot III- ¹²⁵ I	Aah II- ¹²⁵ I	Norme
Pourcentages de liaison (%)	1	0	69	55	≥ 30%
	1/5	0	53	41	
	1/50	0	21	30	
	1/500	0	10	13	

Le contrôle négatif est représenté par le même mélange réactionnel que ceux des échantillons à tester, mais exempt d'anticorps spécifiques. L'anticorps anti-Bot III utilisé est prélevé des souris immunisées contre la toxine Bot III, les titres des antisérums sont indiqués dans la partie consacrée à la Production d'anticorps monoclonaux anti-Bot III. Les fragments F(ab)₂ spécifiques au venin d'Aah, ont été utilisés pour la révélation du complexe Ag*-Ac.

Selon les résultats ci-dessus, les traceurs peuvent être utilisés purs ou dilués à des concentrations minimales de 1/5 pour Bot III-¹²⁵I et de 1/50 pour Aah II-¹²⁵I.

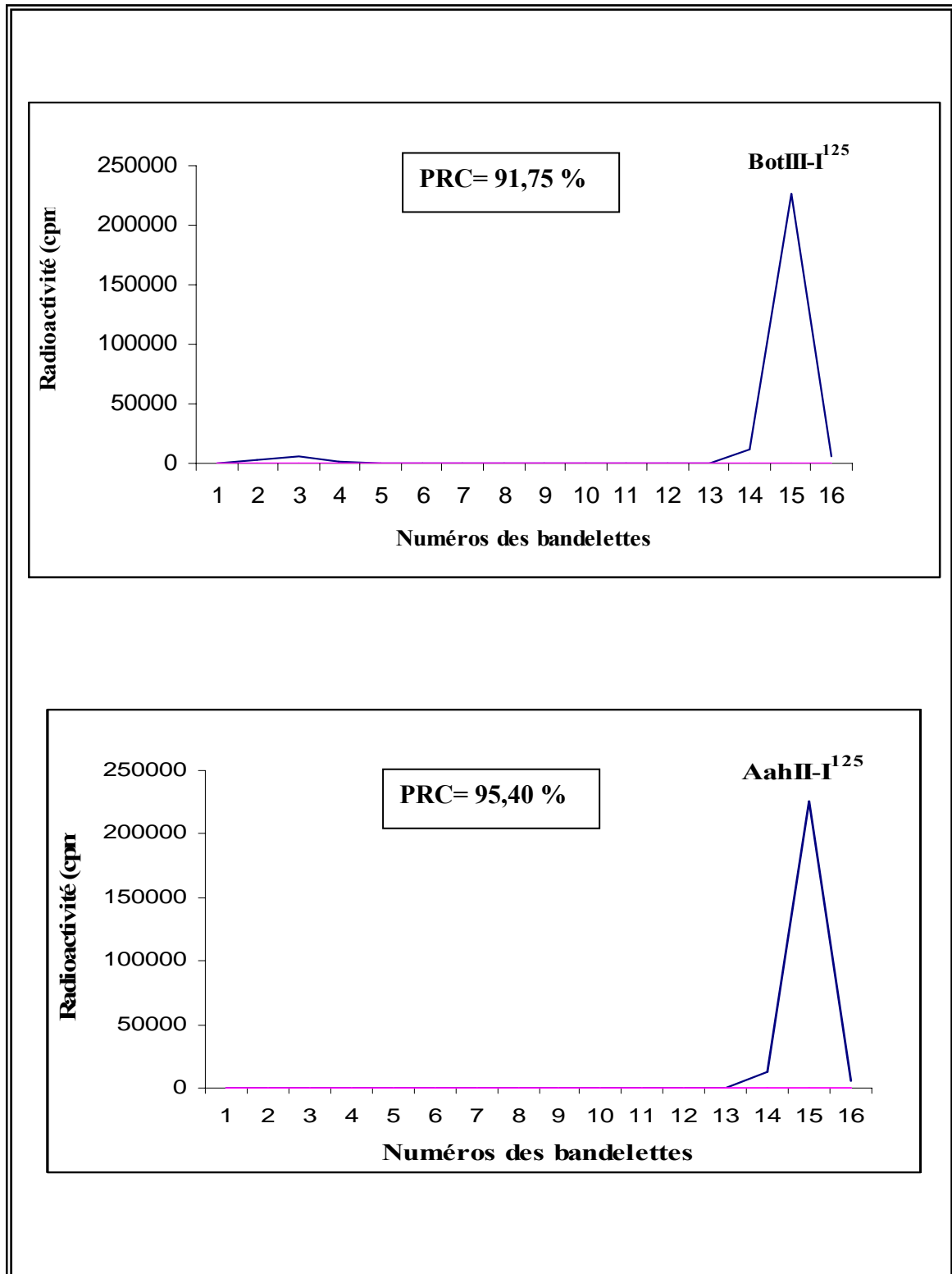


Figure 19: Profils Chromatographiques d'ascendance sur papier ITLC-SG, des traceurs Bot III-¹²⁵I et Aah II-¹²⁵I purifiés. (Phase mobile : Méthanol/Eau, 85/15, v/v)

I-1-4) Stabilité des toxines radiomarquées dans le sang:

L'étude de la stabilité des toxines marquées a été vérifiée par Chromatographie ascendante sur couche mince (ITLC), et par étude de l'immuno-réactivité, à 24 heures d'incubation à 37°C, dans le sang.

Les protéines marquées demeurent stables, pendant au moins 24 heures dans le sang. Les chromatogrammes révèlent la présence d'un seul pic correspondant aux traceurs, avec des PRC supérieures à 90%, pour les deux toxines Bot III-¹²⁵I et Aah II-¹²⁵I, et sont respectivement de 90,05% et de 90,16%. (Figure 20)

Les résultats du test RIA effectué pour l'étude de l'immuno-réactivité des traceurs, après 24 heures d'incubation à 37°C, affirment cette stabilité, puisque les pourcentages de liaison demeurent, dans les normes préconisées dans la littérature, c'est-à-dire supérieurs à 30%. (Tableau XI)

Tableau XI : Etude de l'immuno-réactivité des toxines radiomarquées, Après 24 heures d'incubation à 37°C, évaluée par RIA..

Echantillons	Dilutions	Contrôle négatif	Bot III-I ¹²⁵	Aah II-I ¹²⁵	Norme
Pourcentages de liaison (%) à J ₁	1	0	70,5	52,3	≥ 30%
	1/5	0	55	38,21	
	1/50	0	/	28,7	

I-1-5) Conclusion :

L'utilisation de la chloramine -T comme agent oxydant, à une concentration bien déterminée, et le respect du temps réactionnel, pour le marquage des protéines à l'iode radioactif 125, ont permis d'aboutir à des rendements satisfaisants comparés aux résultats rapportés par la littérature (Hunter; 1970 et Patricia; 1980).

La purification des toxines marquées par chromatographie d'exclusion moléculaire sur gel de sephadex G-25, permet de séparer les molécules marquées non endommagées des impuretés et des éventuels produits de dégradation présents dans le mélange réactionnel. Dans les présents travaux, les puretés radiochimiques obtenues sont satisfaisantes.

L'activité spécifique d'un traceur est la conséquence directe de la proportion du radio-isotope introduit par molécule (Bador et al; 1988). Son augmentation conditionne directement la limite de détection du dosage, alors qu'une faible activité spécifique du traceur entraîne un faible rendement de détection et de ce fait une faible sensibilité du dosage.

Les rendements de marquage ainsi que les PRC concordent parfaitement avec les normes exigées par la Pharmacopée Européenne appliquées aux radiopharmaceutiques.

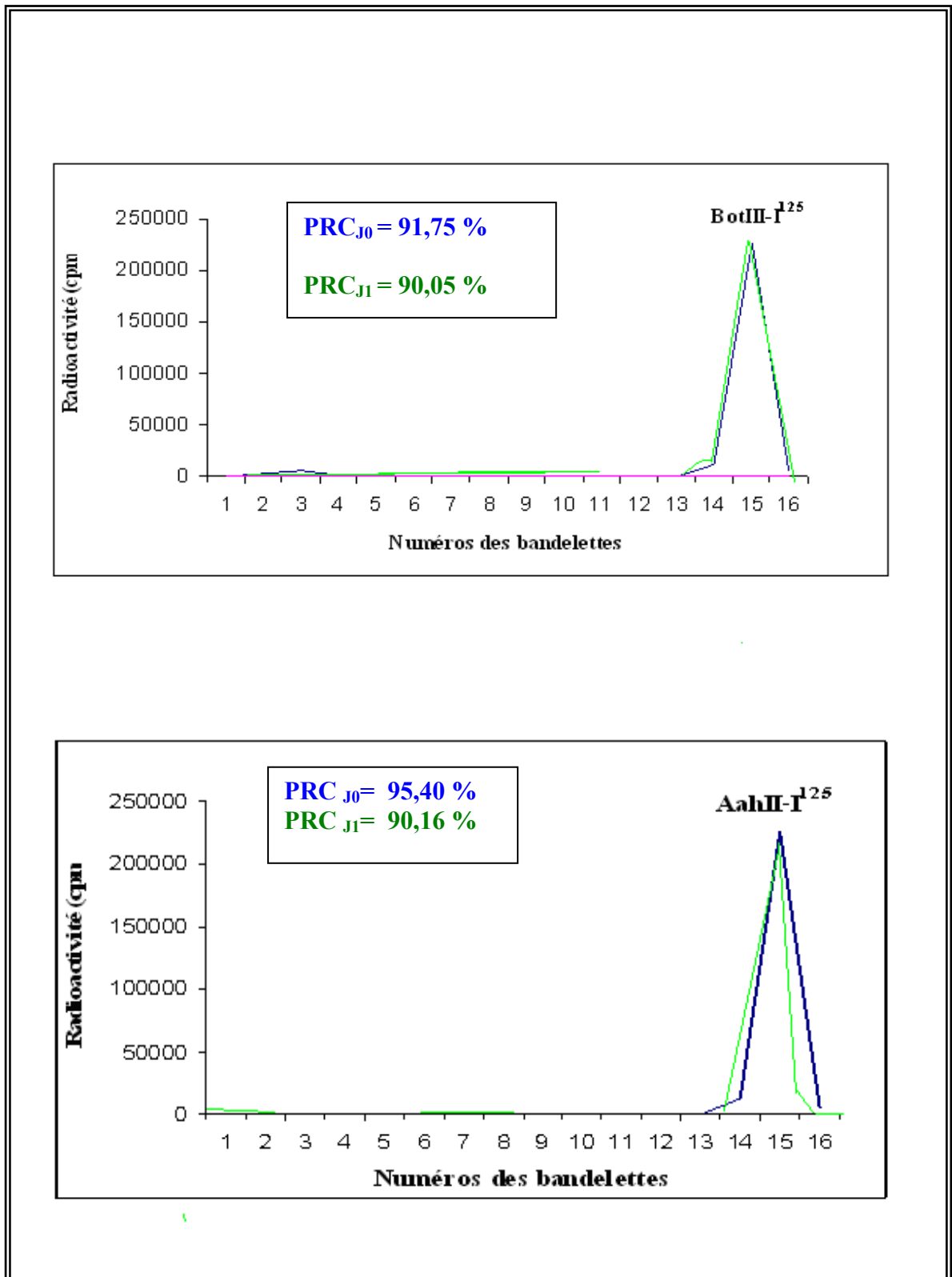


Figure 20 : Profils Chromatographiques d'ascendance sur papier ITLC-SG, des toxines Bot III-¹²⁵I et Aah II-¹²⁵I : le jour de leur production (bleu), et à 24 heures d'incubation (vert).
(Phase mobile : Méthanol/eau, 85/ 15, v/v)

Les paramètres radiochimiques des traceurs préparés, ainsi que leur stabilité après 24 heures de conservation, sont satisfaisants, ce qui laisse présager une bonne stratégie et une bonne stabilité de marquage *in vitro*. Ces résultats sont en faveur d'une étude de la biodistribution sur des modèles animaux.

I-2) Marquage au technétium 99m et contrôle de qualité des venins :

I-2-1) Marquage des venins au ^{99m}Tc :

Le marquage des venins de Bot et d'Aah est spécifique avec un bon rendement et une pureté radiochimique supérieure à 90%. La cinétique de complexation des venins est rapide reproductible et complète. Un seul composé est observé.

I-2-2) Contrôle de qualité des venins marqués :

I-2-2-1) Contrôle de la pureté radiochimique de l'isotope et des traceurs :

La pureté radiochimique a été déterminée par chromatographie ascendante sur papier ITLC-SG, développée avec différents solvants : NaCl à 0,9%, Acétone, Méthyle-éthyle-cétone, et le mélange tertiaire Ethanol-Eau- Ammoniaque. Les bandes chromatographiques sont directement analysées sur un radio chromatographe à haute pression (HPTLC) muni d'une sonde gamma.

Le pertechnétate de sodium (NaTcO₄) fraîchement élué du générateur ⁹⁹Mo/^{99m}Tc, ainsi que le kit MDP marqué *in situ* au Centre de Recherche Nucléaire, présentent des puretés radiochimiques très satisfaisantes (supérieures à 99%), favorisant ainsi leur utilisation *in vitro* et *in vivo*.(Figure 21)

Une meilleure séparation chromatographique du traceur Aah-^{99m}Tc, a été obtenue avec seulement deux solvants ; il s'agit du Méthyle éthyle cétone pour la révélation du technétium sous sa forme oxydée, et le mélange tertiaire : Ethanol-Eau- Ammoniaque, pour la révélation de sa forme colloïdale. Les profils chromatographiques, révèlent la présence de quelques contaminants de technétium libre dans la préparation du traceur Aah-^{99m}Tc, laissant présager une réaction de marquage incomplète, avec une pureté radiochimique de 89,5% . (Figure 22)

Les radiochromatogrammes correspondants au venin de Bot-^{99m}Tc, développés avec différentes phases mobiles, affirment la présence d'un seul pic, caractéristique de la protéine marquée. Ne seront montrés dans ce manuscrit que les profils développés sur les deux phases mobiles suscitées. La pureté radiochimique étant supérieure à 99% (Figure 23). Les puretés radiochimiques déterminées pour chaque traceur, ainsi que pour le kit technetié : MDP et le radioélément ^{99m}Tc, sont résumés dans le tableau XII.

Tableau XII : Puretés radiochimiques des molécules technétiées

Echantillon	NaTcO ₄	^{99m} Tc -MDP	^{99m} Tc -Bot	^{99m} Tc –Aah
PRC (%)	99,99	99,70	99,61	89,5 (TcO₄)
Norme	> 90 %			

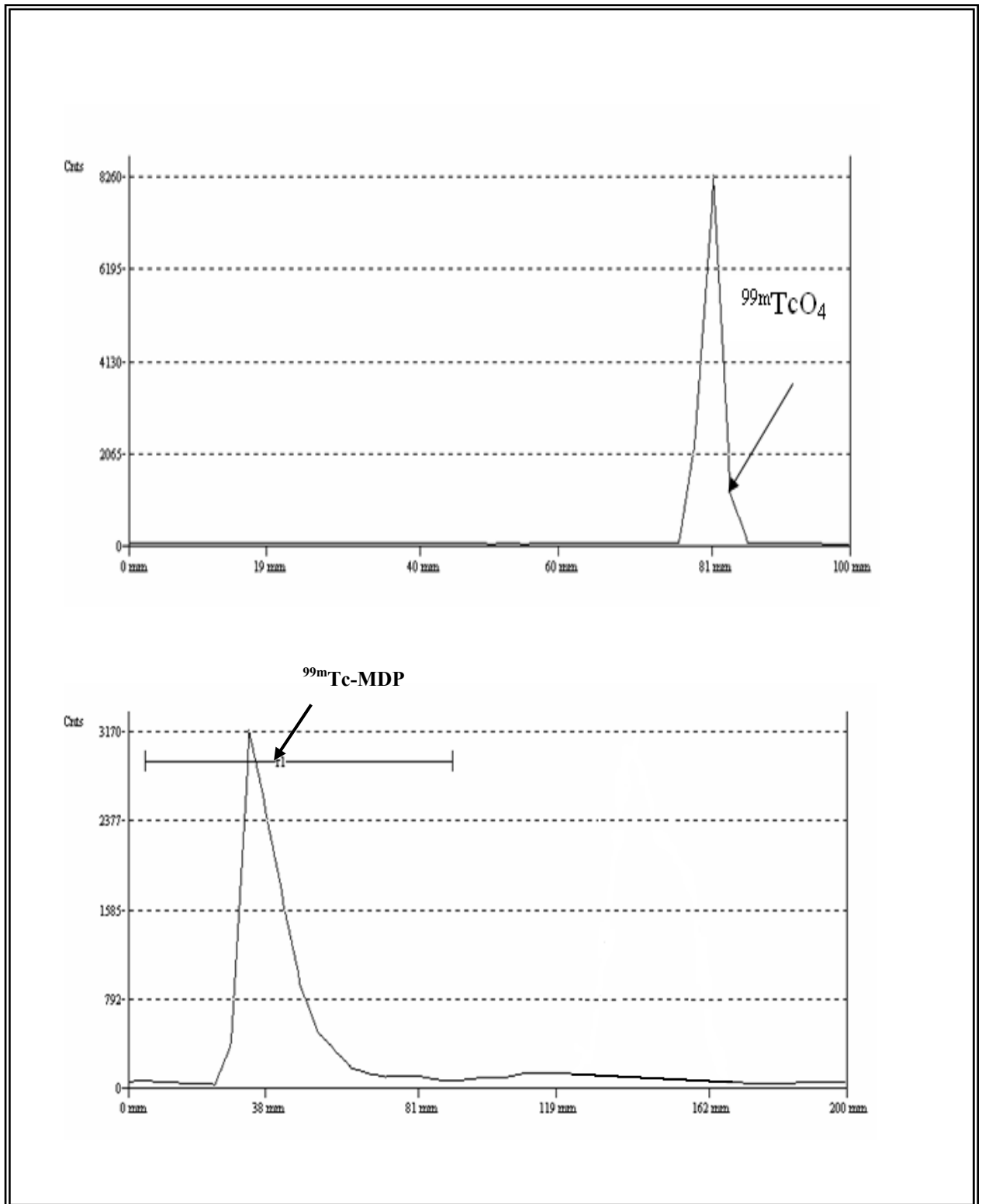


Figure 21 : Profils chromatographiques d'ascendance sur papier ITLC-SG du pertechnetate de sodium élué du générateur $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$ (haut), et du kit technétié MDP (bas). (Phase mobile: Méthyle-Ethyle-Cétone)

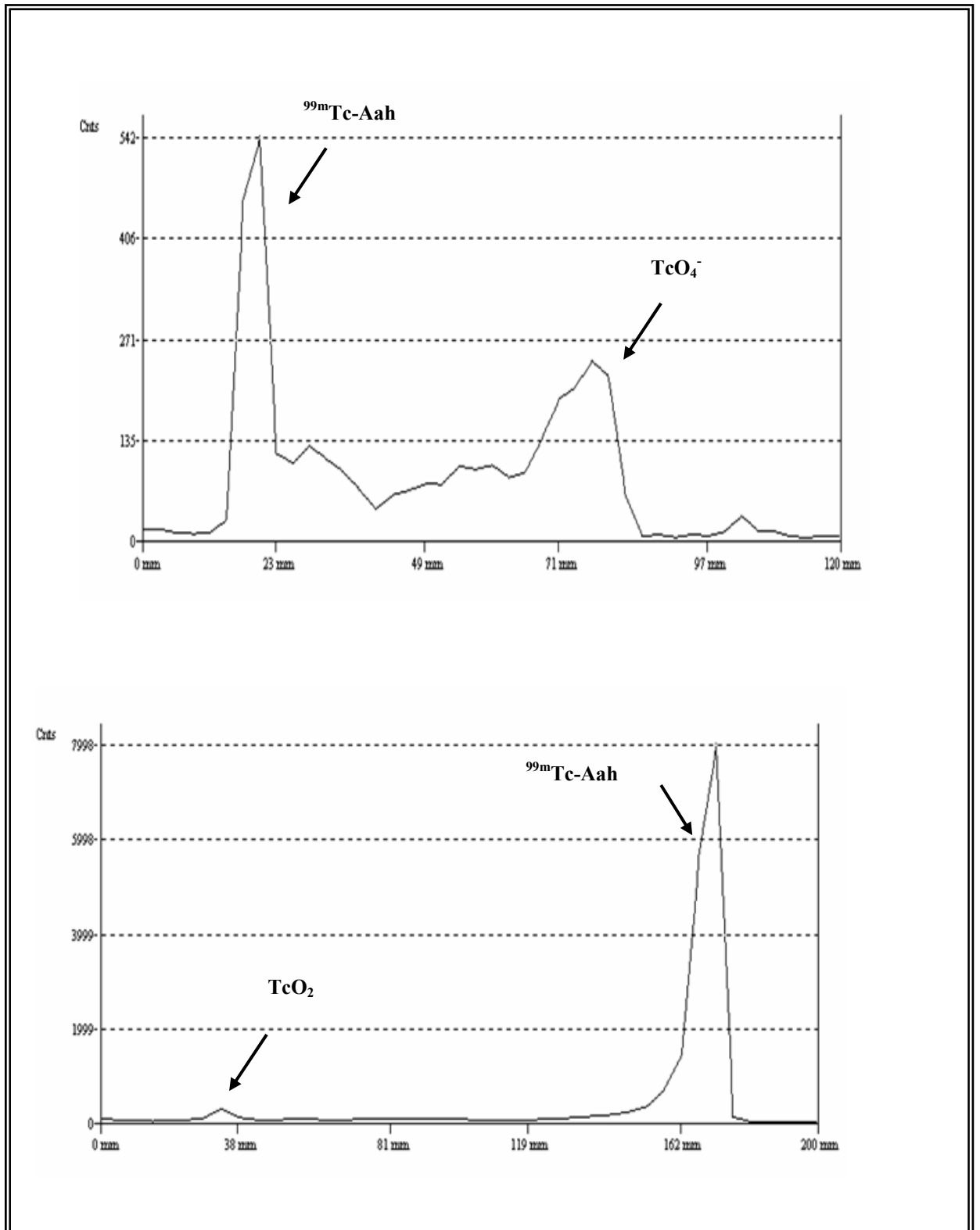


Figure22 : Profils chromatographiques d'ascendance sur papier ITLC-SG du $^{99m}\text{Tc-Aah}$, développées sur les phases mobiles : Méthyle-éthyle-cétone (haut), et Ethanol-ammoniaque-eau (bas).

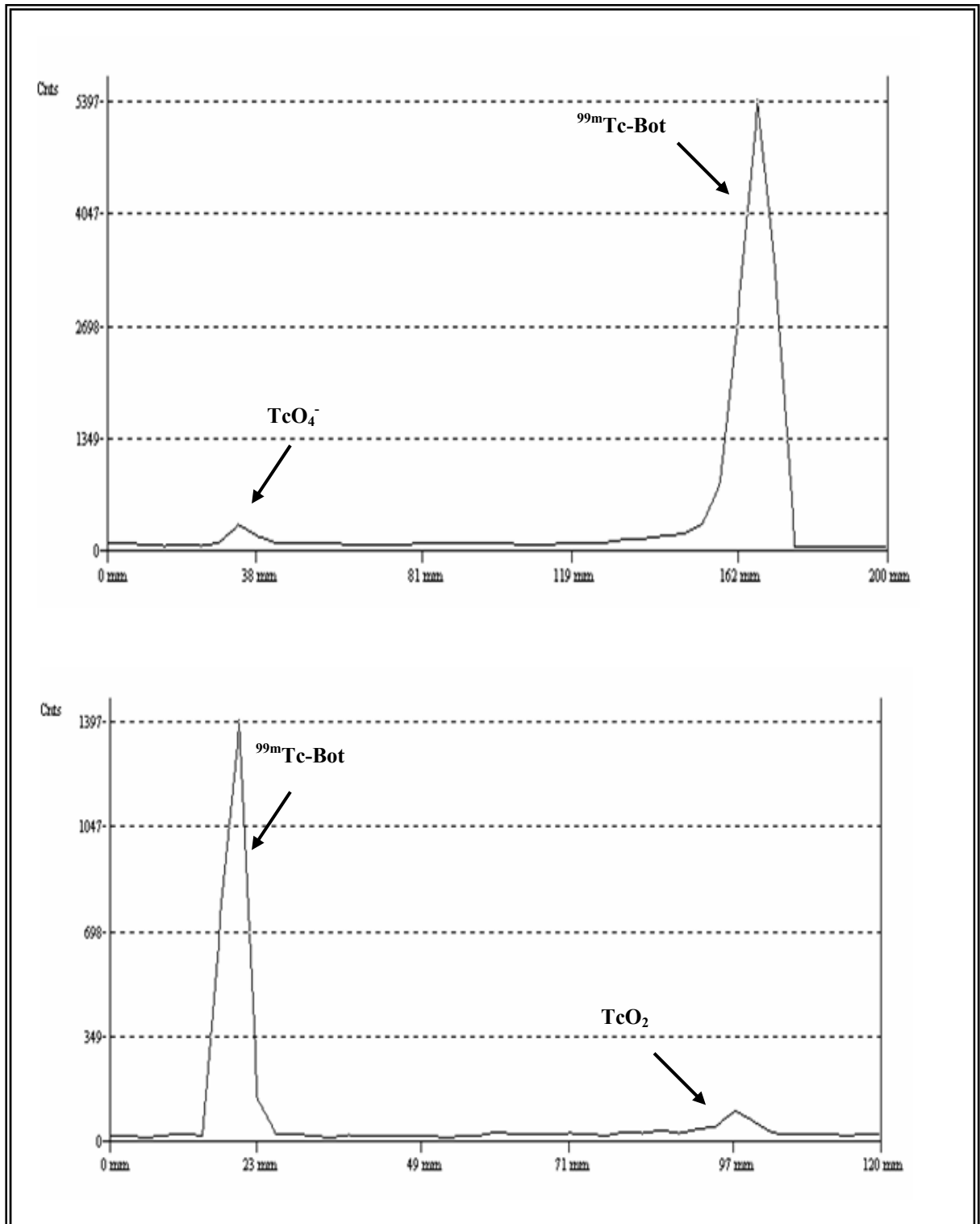


Figure 23 : Profils chromatographiques d'ascendance sur papier ITLC-SG du venin technétié de $^{99m}\text{Tc-Bot}$, développés sur les phases mobiles : Ethanol-ammoniaque-eau (haut), et Méthyle-éthyle-cétone (bas).

I-2-3) Immuno réactivité :

Les résultats du test RIA appliqué sur les venins marqués purs et dilués, affirment bien leur intégrité structurale (Tableau XIII).

Tableau XIII : Etude de l'immuno- réactivité des venins technétiés évaluée par RIA.

Echantillons	Dilutions	Contrôle négatif	Bot- ^{99m} Tc	Aah- ^{99m} Tc	Norme
Pourcentages de liaison (%)	1	0	51	49	≥ 30%
	1/5	0	42	38,7	
	1/50	0	34	29,9	
	1/500	0	25	15	

Le contrôle négatif est représenté par le même mélange réactionnel que ceux des échantillons à tester, mais exempt d'anticorps spécifiques.

L'anticorps anti-Bot utilisé est prélevé des souris immunisées contre la toxine Bot III, les titres des antisérums sont indiqués dans la partie consacrée à la Production d'anticorps monoclonaux anti-Bot III. Les fragments F(ab)₂ spécifiques au venin d'Aah, ont été utilisés pour la révélation du complexe Ag*-Ac.

Selon les résultats ci-dessus, les traceurs peuvent être utilisés purs ou dilués à une concentration minimale de 1/50.

I-2-4) Stabilité des traceurs dans le sang:

Les protéines marquées demeurent stables, pendant au moins 24 heures, à 37°C dans le sang ; les chromatogrammes révèlent la présence d'un seul pic correspondant aux traceurs, avec des PRC avoisinant ou égale à 90%, soit respectivement pour Aah-^{99m}Tc et Bot-^{99m}Tc de 80,23% et 90,02%. (Figure 24)

Les résultats de l'immuno- réactivité révélés par RIA, des venins marqués après 24 heures de leur production, affirment cette stabilité, puisque les pourcentages de liaison demeurent dans les normes requises dans la littérature. (Tableau XIV)

I-2-5) Conclusion :

Les paramètres radiochimiques des traceurs préparés ^{99m}Tc-Bot et ^{99m}Tc-Aah, ainsi que leur stabilité à 24 heures d'incubation à 37°C, sont satisfaisants, ce qui laisse conclure une bonne stratégie de marquage *in vitro*. Ces résultats sont en faveur d'une étude de la biodistribution sur des modèles animaux.

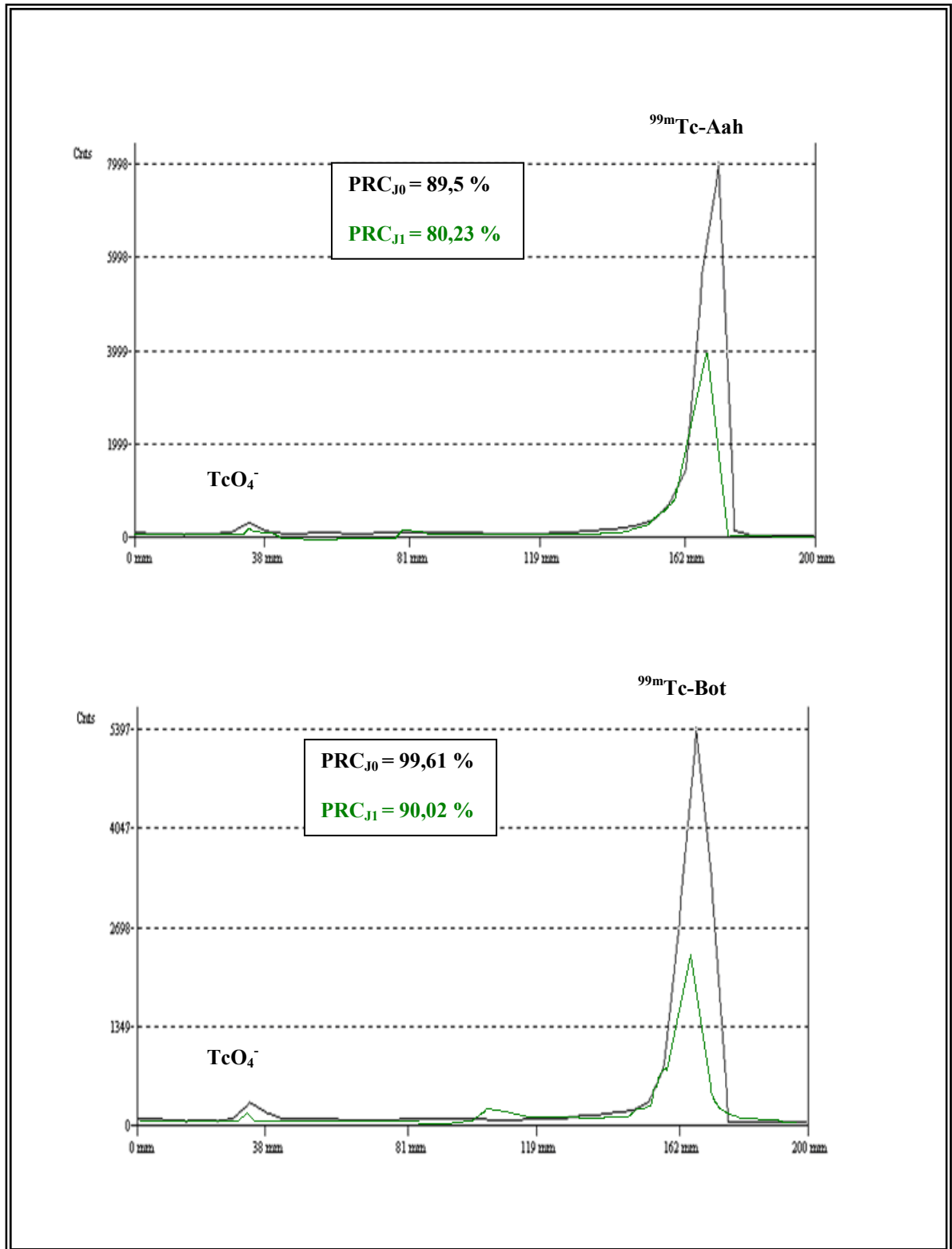


Figure 24: Profils Chromatographiques d'ascendance sur papier ITLC-SG, des venins technétiés de Bot- ^{99m}Tc et d'Aah- ^{99m}Tc le jour de leur production (noir), et à 24 heures de conservation (vert). (phase mobile : Ethanol-ammoniaque-eau)

Tableau XIV : Etude de l'immuno- réactivité des venins radiomarqués, après 24 heures de leur production, évaluée par RIA.

Echantillons	Dilutions	Contrôle négatif	Bot- ^{99m} Tc	Aah- ^{99m} Tc	Norme
Pourcentages de liaison à J₁ (%)	1	0	69,75	39,6	≥ 30%
	1/5	0	45,5	29,95	
	1/50	0	/	/	

II) ETUDE PHARMACOTOXICOLOGIQUE DES PROTEINES RADIOMAQUEES :

La cinétique de distribution des venins et toxines a été déterminée par dissection d'animaux et par détection externe via une gamma caméra. Deux voies d'injection ont été explorées lors de cette étude ; les voies : sous-cutanée, afin de mimer l'envenimation scorpionique accidentelle, et intraveineuse pour une appréciation meilleure des caractéristiques toxicocinétique et toxico- dynamique des venins et toxines de scorpion.

Des doses sublétales des venins et toxines ont été injectées aux souris. Les doses radioactives administrées aux souris sont de l'ordre de 200µCi (7,4 MBq) par souris pour les traceurs iodés, et de 1mCi (37 MBq) par souris pour les traceurs technétiés.

Des échantillons de sang et des principaux organes ont été prélevés, et pesés. La radioactivité est mesurée au compteur gamma pour l'étude de la biodistribution. Les résultats sont exprimés en pourcentage de radioactivité injectée par organe.

Dans un premier temps, la cinétique de bio distribution des traceurs est analysée sur un modèle animal murin (n=3), puis comparée selon les voies d'injection, le type de traceurs (venin, toxine) et de radioéléments (iode¹²⁵, technétium ^{99m}) utilisé. Certains résultats sont corrélés à l'étude des images scintigraphiques pratiquées sur le rat.

II-1) BIODISTRIBUTION DES TOXINES RADIOIODEES :

Les souris ont été envenimées par voie sous-cutanée avec une dose sublétale d'Aah II de 0,1 µg pour 20 g de souris ou de 0,3 µg de Bot III pour 20 g de souris. Des prélèvements de sang, de tissu du site d'injection et des principaux organes (Foie, cœur, poumons, reins, rate, cerveau, estomac, intestins, et vessie), ont été effectués selon une cinétique allant de 30 minutes à 1440 minutes.

L'iode radioactif a également été testé pour sa cinétique de distribution, avec des doses radioactives identiques et dans les mêmes conditions d'injection et de dissection que celles suivies pour les toxines.

La figure 25 montre une diffusion rapide du radioélément vers les organes à partir de son site d'injection. Avec une accumulation préférentielle au bout d'une heure post-injection au niveau stomacal, et de 30 minutes post-injection au niveau musculaire .

La concentration sérique maximale est atteinte dès les premières 30 minutes de l'injection de l'iode 125 I, pour diminuer progressivement . Néanmoins elle reste détectable à 1440 minutes post-injection, signalant une élimination hépatobiliaire et rénale lente (Tableau XV) .

L'étude de biodistribution ne met pas en évidence de différences de la toxicocinétique des toxines Bot III et Aah II, injectées par voie sous-cutanée (Figures 26 et 27) . La diffusion des toxines du site d'injection vers le sang est rapide ; une activité maximale est observée, dès 30 minutes d'envenimation, puis diminue progressivement pour atteindre des taux sériques inférieurs à 10% de la dose injectée. Au bout de 1440 minutes de l'envenimation, l'activité sérique résiduelle reste détectable.

Une accumulation maximale des toxines au niveau hépatique et rénal, dépassant 15% de la dose injectée, est détectée à 30 minutes post-injection, laissant conclure que le métabolisme et l'élimination des toxines s'opèrent dans le foie et les reins (Tableaux XVI et XVII).

La radioactivité apparaît progressivement dans les autres organes, pour atteindre des maxima au bout de 60 minutes post-injection pour les muscles et les os, et de 180 minutes pour l'estomac et l'intestin.

Des activités supérieures à 25% de la dose injectée sont observées aux niveaux musculaire à 60 minutes post-injection et stomacal à 180 minutes post-injection ; ce qui expliquerait les perturbations physiologiques générales (nausées, vomissements) et neuromusculaires (paralyse, raideur musculaire) notifiées chez les victimes d'envenimation scorpionique. (Bessalem *et al.*, 2002)

Après l'envenimation expérimentale, les toxines sont retrouvées préférentiellement dans les muscles, foie, reins, intestin et, os. Ces organes sont énumérés dans l'ordre décroissant de l'intensité radioactive mesurée, et ils semblent être les organes cibles des principales toxines des venins de Bot et Aah.

Une légère accumulation est retrouvée dans la rate, le cœur, et les poumons, avec une activité nulle au niveau du cerveau confirmant l'inaccessibilité des toxines à travers la barrière hémato –encéphalique, déjà signalée dans les travaux de Clot-Faybesse et collaborateurs (2000).

Durant toute cette étude, les activités sériques et tissulaires d'Aah II- 125 I sont plus importantes que celles de Bot III- 125 I, ce qui peut être expliqué par la forte toxicité et affinité d'Aah II vis-à-vis des récepteurs spécifiques (Gordon *et al.*, 1996), par rapport à celles de Bot III.

Tableau XV : Biodistribution de ^{125}I injecté par voie sous-cutanée chez la souris.
(Valeurs exprimées en pourcentage de radioactivité accumulée par organe par rapport à la dose du radioélément injectée)

Organes	30 minutes	60 minutes	180 minutes	1440 minutes
Sang	25,21	23,61	15,23	5,26
Intestins	14,86	6,72	12,86	5,21
Vessie	2,63	1,32	2,12	0
Foie	10,01	9,09	6,23	0
Rate	0,89	0,70	0,5	0
Reins	5,23	3,89	2,21	0
Estomac	10,68	12,43	10,53	3,2
Poumons	2,55	1,22	0,99	0
Cœur	0,86	1,64	0,75	0
Cerveau	0,36	0,25	0,16	0
Muscle	30,01	27,16	12,89	4,31
Os	15,21	13,28	6,64	0
Site d'injection	0,32	0,15	0,05	0

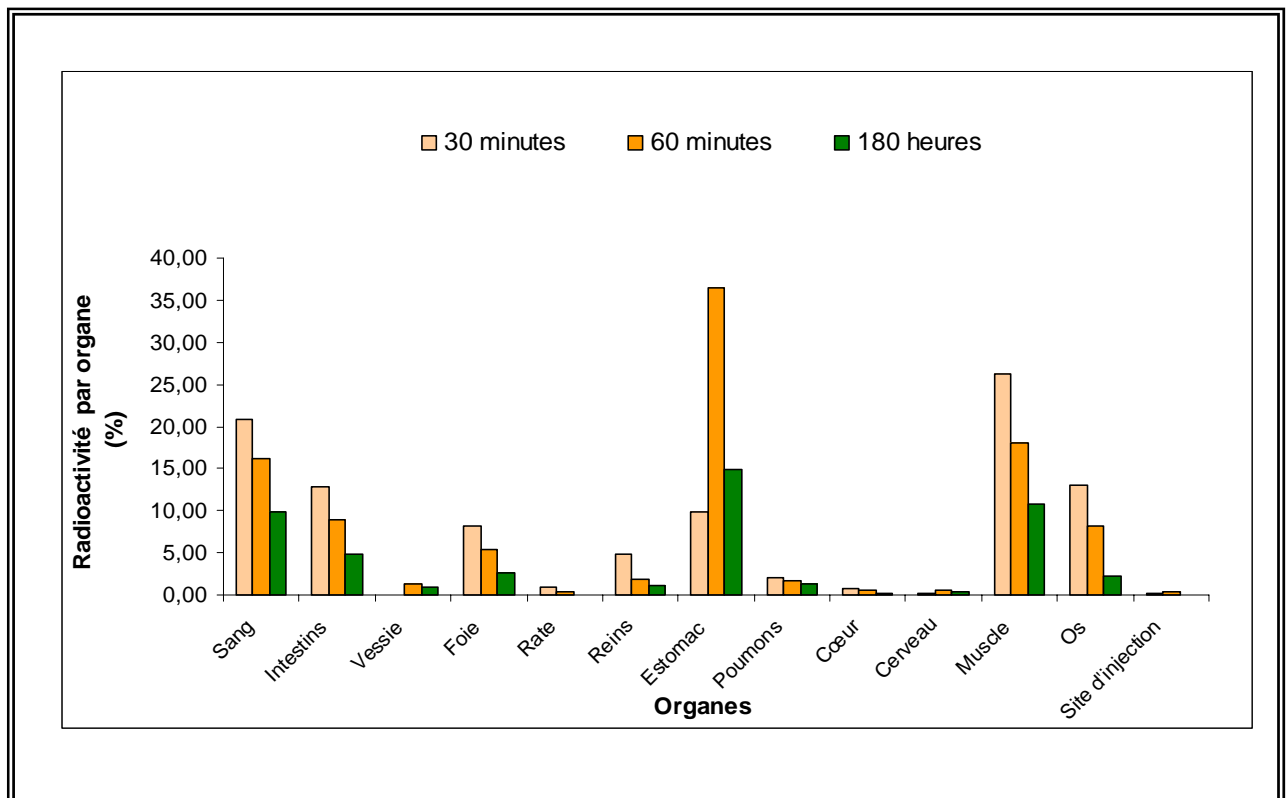


Figure 25 : Cinétique de distribution de ^{125}I administré à la souris, par voie sous-cutanée.

Tableau XVI : Biodistribution de Bot III-¹²⁵I chez la souris envenimée avec une dose sub létale, par voie sous-cutanée . (n=3)
(Valeurs exprimées en pourcentage de radioactivité accumulée par organe par rapport à la dose du radioélément injectée)

Organes	30 minutes	60 minutes	180 minutes	1440 minutes
Sang	17,01 ± 3,79	14,26 ± 2,36	8,27 ± 2,8	2,21 ± 0,65
Intestins	9,32 ± 2,64	10,08 ± 3,2	17,01 ± 3,15	5,81 ± 1,3
Vessie	0,17	0,26	/	/
Foie	16,95 ± 3,87	8,81 ± 1,76	8,62 ± 1,96	2,57 ± 1,22
Rate	0,80 ± 0,24	0,88 ± 0,1	0,98 ± 0,22	0
Reins	14,59 ± 4,70	9,41 ± 4,24	3,54 ± 1,02	0
Estomac	9,66 ± 6,5	16,94 ± 7,21	27,98 ± 8,3	9,65 ± 1,1
Poumons	1,28 ± 0,25	1,11 ± 0,08	1,40 ± 0,11	0
Cœur	0,56 ± 0,04	0,49 ± 0,04	0,60 ± 0,24	0
Cerveau	0,25 ± 0,02	0,32 ± 0,06	0,21 ± 0,04	0
Muscle	20,05 ± 3,42	26,23 ± 4,87	22,42 ± 2,99	7,76 ± 0,32
Os	7,18 ± 0,67	9,51 ± 1,01	8,11 ± 1,24	3,05 ± 1,34
Site d'injection	2,24 ± 3,16	1,81 ± 1,41	0,80 ± 0,15	0

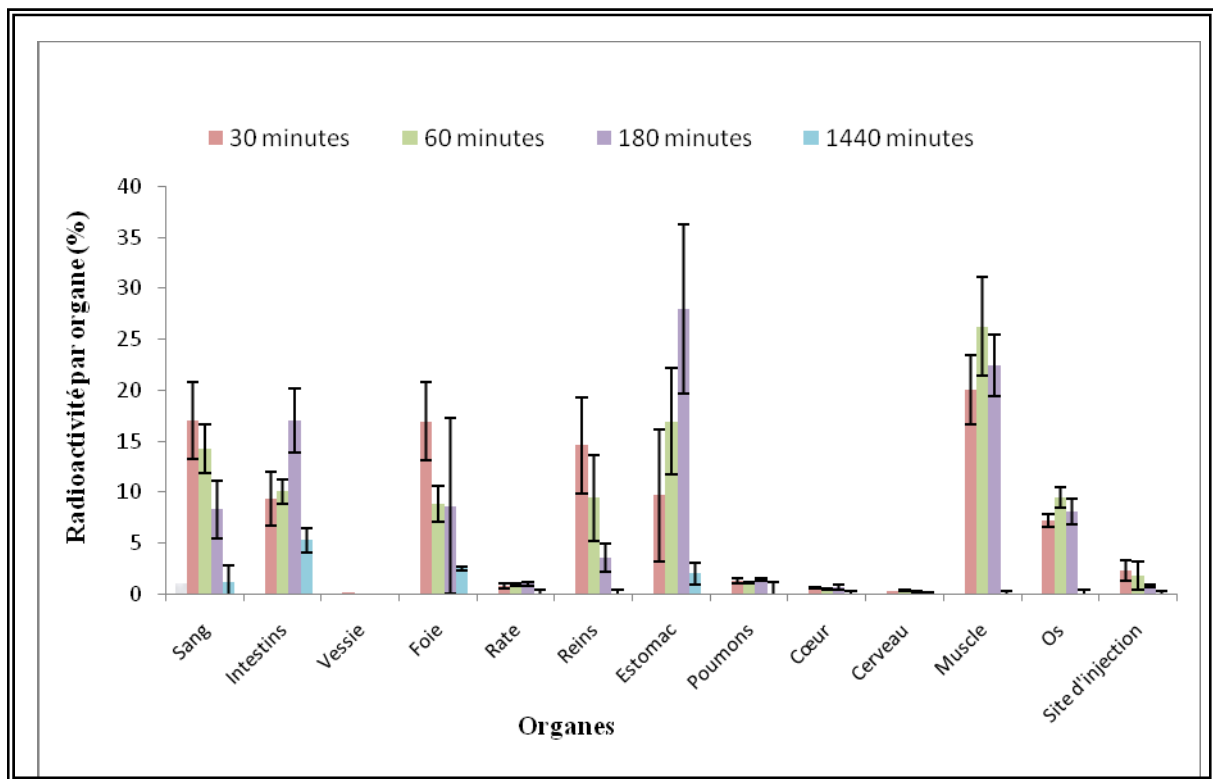


Figure 26 : Etude de la cinétique de biodistribution de Bot III-¹²⁵I chez la souris envenimée avec une dose sub létale, par voie sous-cutanée . (n=3)

Tableau XVII : Biodistribution de Aah II-¹²⁵I chez la souris envenimée avec une dose sub létale, par voie sous-cutanée . (n=3)
(Valeurs exprimées en pourcentage de radioactivité accumulée par organe par rapport à la dose du radioélément injectée)

Organes	30 minutes	60 minutes	180 minutes	1440 minutes
Sang	19,3 ± 5,7	13,07 ± 1,24	7,17 ± 0,51	1,35 ± 0,32
Intestins	9,34 ± 2,59	11,716 ± 1,66	19,71 ± 0,58	5,46 ± 2,1
Vessie	0,34 ± 0,1	0,67 ± 0,16	1,06 ± 0,14	0
Foie	18,4 ± 4,12	9,53 ± 2,4	7,76 ± 2,56	0,53 ± 0,1
Rate	1,22 ± 0,56	1,29 ± 0,29	1,54 ± 0,29	0
Reins	15,7 ± 4,8	12,96 ± 1,14	6,51 ± 0,93	0,6 ± 0,01
Estomac	10,53 ± 6,66	12,93 ± 1,47	34,36 ± 3,68	12,31 ± 0,56
Poumons	2,11 ± 0,24	1,88 ± 0,2	1,50 ± 0,32	0
Cœur	0,77 ± 0,09	0,84 ± 0,12	0,85 ± 0,06	0
Cerveau	0,34 ± 0,12	0,21 ± 0,04	0,14 ± 0,05	0
Muscle	22,41 ± 2,16	31,33 ± 0,31	24,42 ± 0,91	11,56 ± 2,2
Os	6,46 ± 0,83	10,03 ± 0,35	9,13 ± 0,35	1,23 ± 0,21
Site d'injection	1,17 ± 0,42	0,84 ± 0,14	0,51 ± 0,1	0

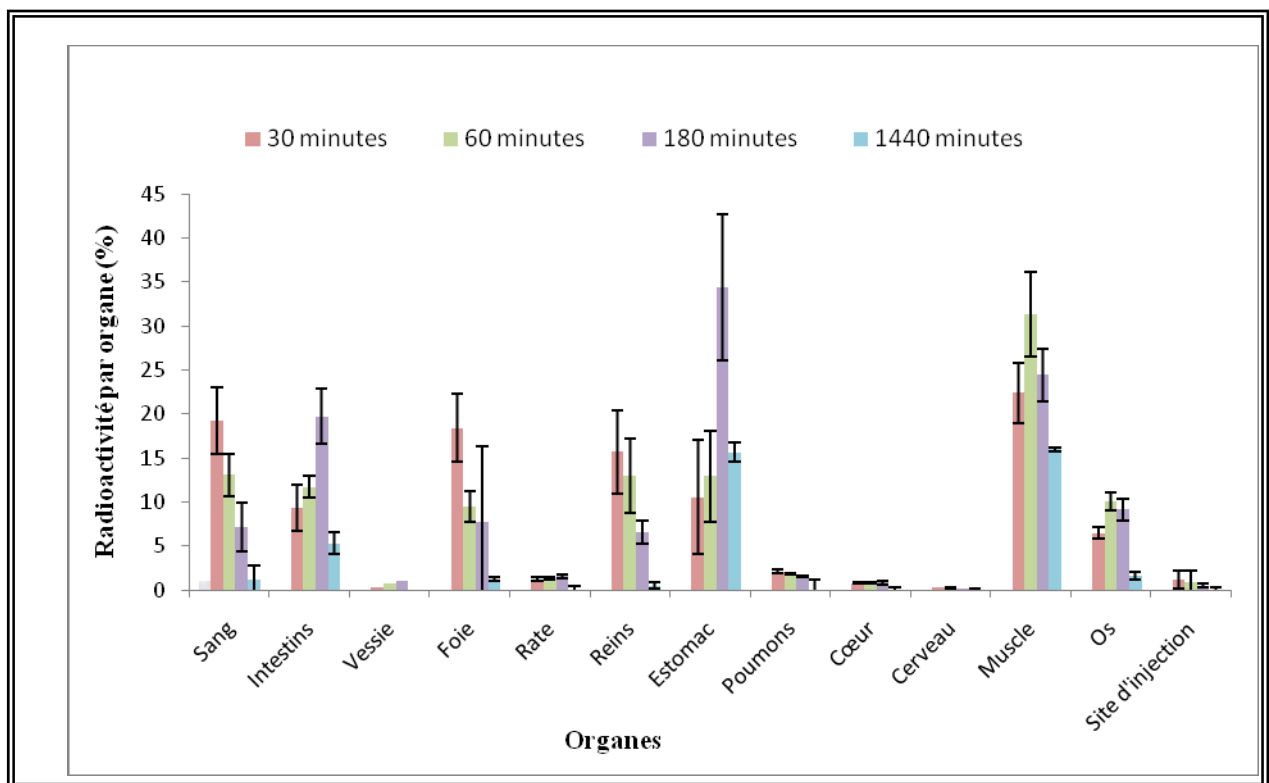


Figure 27 : Etude de la cinétique de biodistribution d'Aah II-¹²⁵I chez la souris envenimée avec une dose sub létale, par voie sous-cutanée . (n=3)

II-2) BIODISTRIBUTION DES VENINS TECHNETIÉS :

II-2-1) voie sous-cutanée :

Les souris ont été envenimées par voie sous-cutanée avec des doses sublétales des venins d'Aah (7,5µg pour 20 g de souris) et de Bot (15µg pour 20 g de souris). Des prélèvements de sang, de tissu du site d'injection et, des principaux organes ont été effectués, selon une cinétique allant de 30 minutes à 1440 minutes.

Le kit technétié MDP, ayant servi de ligand lors du marquage des venins au technétium, a été également testé pour sa cinétique de distribution avec une dose radioactive et des conditions d'injection et de dissection identiques à celles des venins. (Tableau 18). La figure 28 révèle une diffusion lente du kit MDP du site d'injection vers le sang, où le taux maximal n'est atteint qu'au bout de 180 minutes de son administration, alors que sa fixation est déjà importante au niveau osseux et musculaire, atteignant plus de 64% de la dose injectée à 60 minutes post-injection pour l'os et 40 % de la dose injectée à 180 minutes post-injection pour le muscle. La captation osseuse est caractéristique du kit Médronate ; puisqu'il est utilisé comme outil de diagnostic des pathologies osseuses, en médecine nucléaire.

L'étude de la biodistribution ne révèle pas de différence dans la toxicocinétique des venins d'Aah et de Bot. La diffusion des venins du site d'injection vers le sang est moins rapide celle des toxines, puisque l'on note, au bout de 180 minutes d'envenimation expérimentale, une baisse moyenne de 41,24% par rapport à l'activité initiale pour les venins, alors qu'elle est de 47,35% pour les toxines.

Les activités sériques maximales sont détectées à 30 minutes de l'envenimation, et atteignent 26,29 % \pm 0,28 de la dose injectée pour le venin de Bot et 12,14% \pm 0,71 pour le venin d'Aah. (Tableaux XIX et XX) Elles disparaissent progressivement à 1440 minutes post-injection.

Des activités maximales au niveau du foie et des reins n'apparaissent qu'au bout de 60 minutes post-injection, affirmant que l'élimination des venins de Bot et d'Aah est rénale et hépatobiliaire (Ismail et Abd El Salem, 1998, et Murugesan, *et al.*, 1999). Cependant, elle est moins rapide que celle des toxines Bot III et Aah II, puisque des activités supérieures à la dose initiale sont détectées au bout de 180 minutes post-injection pour les venins, alors qu'une baisse de plus de 40% de l'activité initiale est signalée au bout de 180 minutes post-injection pour les toxines. (Figures 29 et 30)

L'accumulation des venins au niveau hépatique explique les dégâts tissulaires engendrés chez les envenimés, puisque plus de 84% de l'activité initiale séjourne dans le foie et demeure détectable après 1440 minutes post-envenimation. La fixation hépatique prolongée est expliquée par la nature non colloïdale du venin technétié, et sa captation se fait donc par les hépatocytes et non par le système réticulo-endothélial (Murugesan *et al.*, 1999). Le métabolisme et l'élimination des venins s'opèrent au niveau hépatobiliaire et rénal, confirmé par l'apparition d'activité dans l'intestin et la vessie.

Contrairement aux observations faites sur la cinétique de distribution des toxines Bot III et Aah II, des taux élevés sont mesurés au niveau des poumons, du cœur et des muscles, ce qui mène à conclure que les toxines Bot III et Aah II ne sont pas directement responsables des lésions myocardiques et pulmonaires. (Devaux C., *et al.*, 2004)

Tableau XVIII : Biodistribution du kit technétié MDP-^{99m}Tc administré par voie sous-cutanée .
(Valeurs exprimées en pourcentage de radioactivité accumulée par organe par rapport à la dose du radioélément injectée)

Organes	30 minutes	60 minutes	180 minutes	1440 minutes
Sang	4,83	8,74	34,43	0,51
Intestins	5,38	3,79	0,46	0,12
Vessie	0,00	0,25	0,50	0,23
Foie	3,68	1,47	0,93	0,54
Rate	0,67	0,53	0,52	0,13
Reins	3,42	2,82	0,61	0,35
Estomac	3,56	1,05	0,85	0,56
Poumons	1,71	0,38	0,48	0,12
Cœur	0,82	0,24	0,49	0,12
Cerveau	0,53	0,25	1,05	0,72
Muscle	30,93	10,10	39,30	12,3
Os	38,96	64,24	19,80	5,46
Site d'injection	5,52	6,14	0,57	0,01

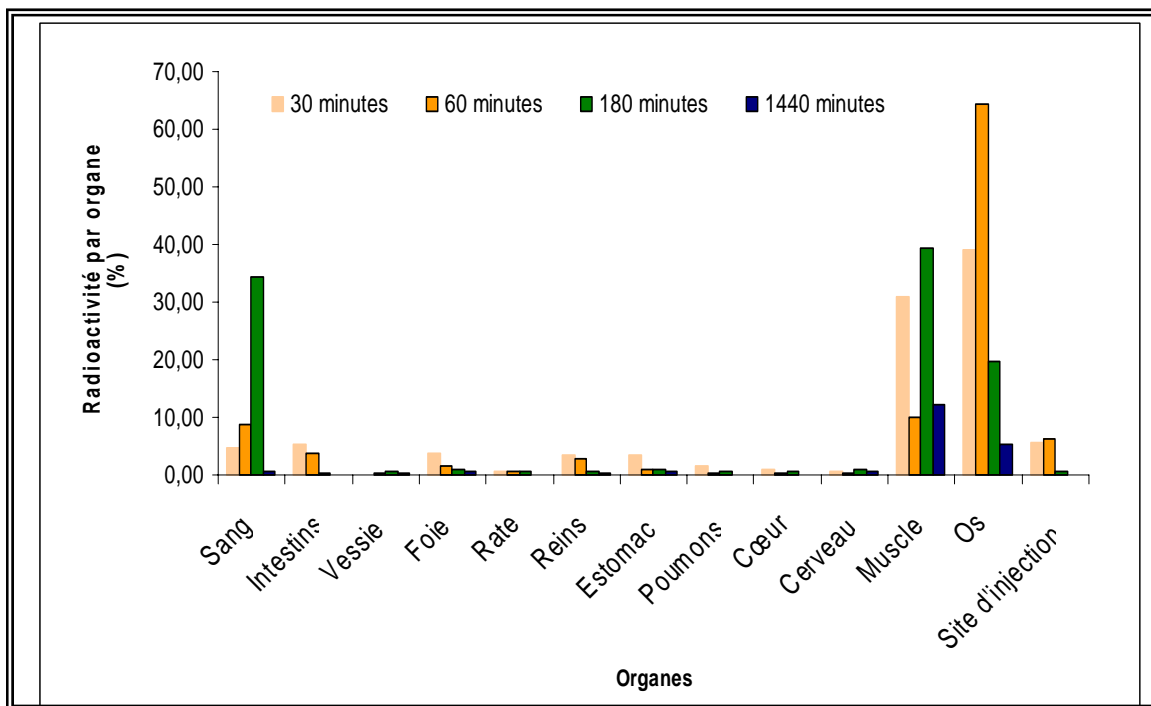


Figure 28 : Cinétique de biodistribution du kit technétié MDP-^{99m}Tc administré par voie sous-cutanée.

Tableau XIV : Biodistribution du venin d'Aah-^{99m}Tc chez la souris envenimée avec une dose sublétales ; par voie sous-cutanée . (n=3)
(Valeurs exprimées en pourcentage de radioactivité accumulée par organe par rapport à la dose du radioélément injectée)

Organes	30 minutes	60 minutes	180 minutes	1440 minutes
Sang	12,14 ± 0,71	9,38 ± 0,43	5,61 ± 0,52	1,36 ± 0,49
Intestins	0,3 ± 0,05	0,93 ± 0,07	0,56 ± 0,12	0,44 ± 0,18
Vessie	0,23 ± 0,02	3,26 ± 0,07	1,67 ± 0,34	0,16 ± 0,04
Foie	9,73 ± 0,63	12,94 ± 0,55	8,19 ± 0,17	1,7 ± 0,49
Rate	3,48 ± 0,59	6,55 ± 0,58	4,81 ± 0,13	1,78 ± 0,24
Reins	7,4 ± 1,02	16,17 ± 0,71	10,42 ± 0,48	3,86 ± 0,24
Estomac	0,15 ± 0,04	0,16 ± 0,02	0,78 ± 0,07	0,43 ± 0,11
Poumons	7,86 ± 0,3	6,21 ± 0,08	3,45 ± 0,59	0,78 ± 0,6
Cœur	7,28 ± 0,35	5,98 ± 0,51	3,98 ± 0,45	0,4 ± 0,19
Cerveau	0,01 ± 0,00	0,18 ± 0,03	0,59 ± 0,45	0,06 ± 0,02
Muscle	5,78 ± 0,45	4,37 ± 0,23	1,55 ± 0,26	0,30 ± 0,08
Os	2,28 ± 0,4	2,4 ± 0,17	1,61 ± 0,08	0,64 ± 0,1
Site d'injection	0,14 ± 0,01	0,75 ± 0,15	0,33 ± 0,28	0,13 ± 0,12

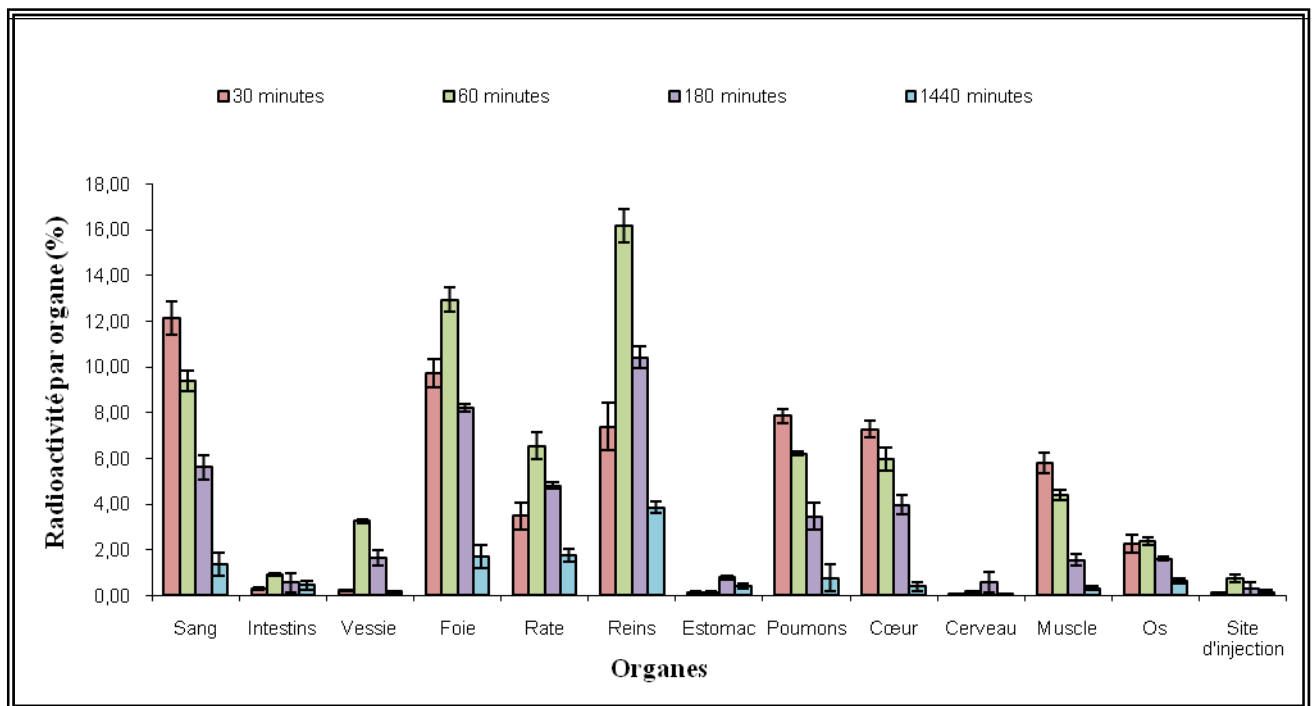


Figure 29 : Etude de la cinétique de distribution par RIA du venin d'Aah-^{99m}Tc chez la souris envenimée avec une dose sublétales ; par voie sous-cutanée . (n=3)

Tableau XX : Biodistribution du venin de Bot-^{99m}Tc chez la souris envenimée avec une dose sublétales ; par voie sous-cutanée . (n=3)
(Valeurs exprimées en pourcentage de radioactivité accumulée par organe par rapport à la dose du radioélément injectée)

Organes	30 minutes	60 minutes	180 minutes	1440 minutes
Sang	26,29 ± 0,28	18,32 ± 1,16	11,92 ± 0,39	3,6 ± 0,39
Intestins	0,88 ± 0,13	1,73 ± 0,29	1,74 ± 0,15	1,07 ± 0,11
Vessie	0,44 ± 0,07	8,47 ± 0,2	3,31 ± 0,13	0,46 ± 0,17
Foie	19,82 ± 0,27	30,32 ± 0,53	18,18 ± 0,19	4,31 ± 0,25
Rate	7,98 ± 0,3	14,16 ± 0,79	9,09 ± 0,14	5,02 ± 0,26
Reins	15,83 ± 0,78	32,31 ± 0,81	19,71 ± 0,37	8,05 ± 0,25
Estomac	0,46 ± 0,11	3,13 ± 0,14	1,96 ± 0,08	1,41 ± 0,17
Poumons	16,06 ± 0,49	13,51 ± 0,49	7,7 ± 0,17	2,05 ± 0,07
Cœur	16,27 ± 0,07	13,14 ± 0,78	9,63 ± 0,26	1,01 ± 0,01
Cerveau	0,04 ± 0,01	3,92 ± 0,6	2,5 ± 0,17	0,12 ± 0,03
Muscle	14,24 ± 0,85	9,77 ± 0,53	4,31 ± 0,36	0,76 ± 0,05
Os	4,78 ± 0,37	5,05 ± 0,66	3,54 ± 0,48	1,52 ± 0,06
Site d'injection	0,35 ± 0,05	2,8 ± 0,65	0,76 ± 0,12	0,42 ± 0,09

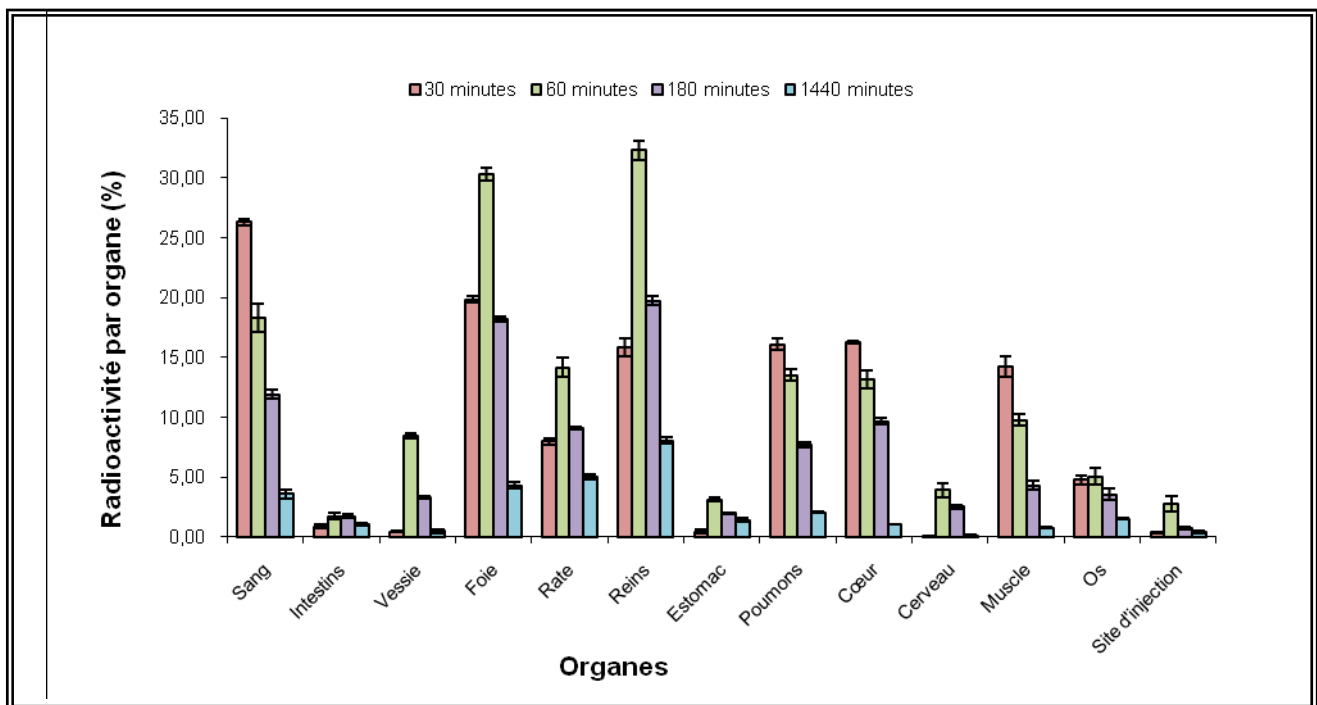


Figure 30 : Etude de la cinétique de distribution par RIA du venin de Bot-^{99m}Tc chez la souris envenimée avec une dose sublétales ; par voie sous-cutanée . (n=3)

II-2-2) voie intraveineuse :

Les souris sont envenimées par voie intraveineuse, au niveau de l'une des veines caudales, avec des doses sublétales en venin d'Aah de 1 µg pour 20g de souris ou en venin de Bot de 2µg pour 20 g de souris. Des prélèvements de sang et des principaux organes sont effectués selon une cinétique, allant de 5 minutes à 1440 minutes.

Le Kit médronate présente une distribution typiquement osseuse, avec une élimination rénale de 80% de la dose injectée au bout des deux premières heures post-injection.

Les venins technétiés injectés par voie intraveineuse, présentent des cinétiques de bio distribution identiques, mais à des intensités différentes. Le venin d'Aah, qui malgré sa faible dose injectée, se manifeste de façon plus intense dans le sang et les tissus, par rapport aux valeurs de radioactivité observées pour le venin de Bot. (Figures 31 et 32)

La diffusion tissulaire des venins à partir du sang, est très rapide, et a lieu dès les premières 5 minutes de leur injection ; puisque plus de 80% de l'activité injectée disparaît du compartiment vasculaire au bout de 60 minutes post-injection pour le venin d'Aah ($10,32\% \pm 1,38$), et 180 minutes post-injection pour le venin de Bot ($10,52\% \pm 0,64$). (Tableaux XXI et XXII)

D'importantes activités sont détectées précocement au niveau des tissus les plus irrigués de l'organisme, à noter en premier lieu et successivement : Cœur ; reins ; rate ; foie ; et poumons. L'accumulation massive des venins au niveau du cœur ($35,64\% \pm 2,75$ pour le venin d'Aah et $25,29\% \pm 0,75$ pour le venin de Bot) tend à diminuer progressivement pour disparaître à 1440 minutes après envenimation.

Les activités maximales au niveau des reins et des poumons sont atteintes à 15 minutes post-injection, et plus tardivement, à 30 minutes post-injection pour celles du foie et de la rate. L'élimination des venins est rapide, et se fait par les voies rénales et hépatobiliaire, puisque des activités considérables sont observées, à partir des premières minutes de l'envenimation, au niveau des reins, du foie et de la vessie. Contrairement aux constatations faites lors des injections sous-cutanées des venins Bot et Aah, leur fixation splénique est plus importante par la voie d'injection intraveineuse.

Cette voie d'injection a été explorée dans plusieurs travaux antérieurs, pour différents venins scorpioniques (Bot, Aah, Aag) : Krifi *et al.*, 2001 et 2005 ; Devaux *et al.*, 2004, qui, de par leurs travaux d'optimisation de l'immunothérapie anti-venin, et d'étude des toxico cinétiques des venins et de leurs toxines, sur différents modèles expérimentaux, convergent vers les mêmes conclusions de distribution des venins et de leurs toxines, à savoir des cinétiques rapides d'absorption ($t_{1/2\alpha}$ moyen = 5,5 minutes), et de distribution ($t_{1/2\gamma}$ moyen = 144,5 minutes).

L'étude de la biodistribution des venins technétiés de Bot et d'Aah, injectés par voie intraveineuse, a été complétée par l'imagerie scintigraphique, dans le but d'établir une corrélation entre les résultats obtenus par dissection d'animaux et ceux obtenus par détection externe par gamma camera.

Tableau XXI : Biodistribution du venin d'Aah-^{99m}Tc chez la souris envenimée par voie intraveineuse avec une dose sub létale .(n=3)
(Valeurs exprimées en pourcentage de radioactivité accumulée par organe par rapport à la dose du radioélément injectée)

Organes	5 minutes	15 minutes	30 minutes	60 minutes	180 minutes	1440 minutes
Sang	55,98 ± 2,78	40,58 ± 0,51	26,23 ± 3,85	10,32 ± 1,38	1,52 ± 0,14	0,09 ± 0,18
Intestins	0,02 ± 0,75	1,35 ± 0,31	10,45 ± 0,05	15,61 ± 0,09	1,03 ± 0,1	0,01 ± 0,25
Vessie	5,23 ± 0,2	12,97 ± 0,36	5,24 ± 1,02	2,56 ± 0,46	1,05 ± 0,23	0,04 ± 0,03
Foie	10,51 ± 3,32	19,63 ± 0,69	30,58 ± 2,31	20,87 ± 0,95	13,22 ± 0,15	1,9 ± 0,32
Rate	18,64 ± 2,21	25,36 ± 0,52	35,16 ± 1,64	19,3 ± 1,21	8,46 ± 0,05	0,15 ± 0,18
Reins	25,18 ± 3,67	39,2 ± 0,42	35,82 ± 1,57	28,99 ± 3,64	20,29 ± 1,28	3,26 ± 0,29
Estomac	0,01 ± 0,02	1,02 ± 0,23	9,12 ± 0,01	18,14 ± 0,2	3,05 ± 0,04	0,01 ± 0,5
Poumons	10,87 ± 3,14	22,46 ± 0,12	18,22 ± 1,3	15,66 ± 0,32	9,45 ± 1,24	0,08 ± 0,12
Cœur	35,64 ± 2,75	24,67 ± 0,02	20,71 ± 0,23	13,05 ± 0,27	7,21 ± 0,2	0,39 ± 0,05
Cerveau	0,01 ± 0,01	0,1 ± 0,03	0,1 ± 0,01	0,01 ± 0,01	0,01 ± 0,01	0,01 ± 0,01
Muscle	0,12 ± 1,31	0,35 ± 0,87	4,31 ± 0,2	1,24 ± 0,01	0,05 ± 0,01	0,01 ± 0,01
Os	0,24 ± 0,01	2,56 ± 0,01	13,04 ± 0,01	19,65 ± 0,05	10,01 ± 0,01	0,01 ± 0,01
Site d'injection	2,98 ± 0,01	2,63 ± 0,02	0,14 ± 0,15	0,09 ± 0,01	0,01 ± 0,01	0,01 ± 0,15

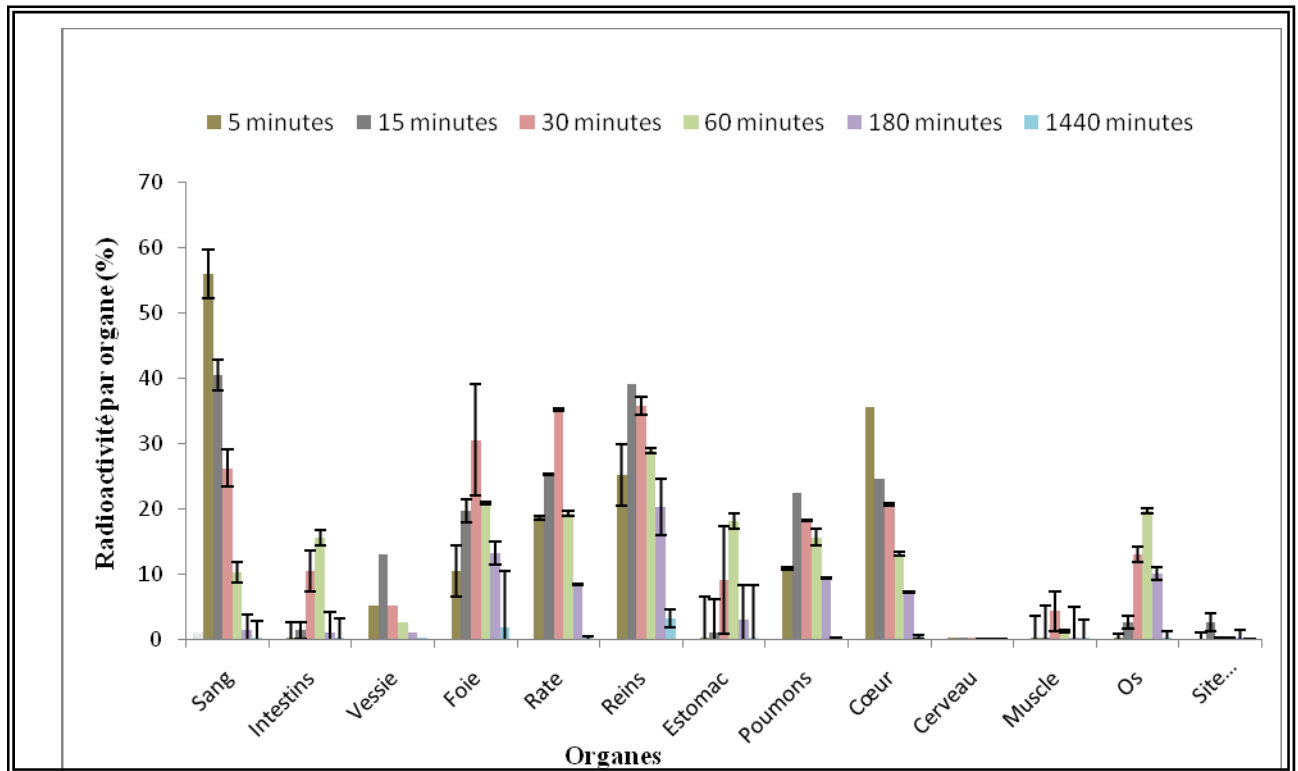


Figure 31: Etude de la cinétique de distribution du venin d'Aah-^{99m}Tc chez la souris envenimée par voie intraveineuse avec une dose sub létale .(n=3)

Tableau XXII : Biodistribution du venin de Bot-^{99m}Tc chez la souris envenimée par voie intraveineuse avec une dose sublétales .(n=3)
(Valeurs exprimées en pourcentage de radioactivité accumulée par organe par rapport à la dose du radioélément injectée)

Organes	5 minutes	15 minutes	30 minutes	60 minutes	180 minutes	1440 minutes
Sang	47,98 ± 0,2	40,21 ± 1,23	35,64 ± 0,84	21,32 ± 0,45	10,52 ± 0,64	0,01 ± 0,18
Intestins	0,02 ± 0,01	1,2 ± 1,26	6,58 ± 0,06	11,12 ± 0,07	0,03 ± 0,1	0,01 ± 0,25
Vessie	3,01 ± 0,01	10,24 ± 0,58	7,98 ± 0,02	5,02 ± 0,05	2,05 ± 0,21	0,02 ± 0,03
Foie	7,28 ± 0,87	17,21 ± 0,65	25,02 ± 0,4	19,3 ± 0,05	11,9 ± 0,11	2,47 ± 0,32
Rate	16,35 ± 0,71	24,69 ± 0,21	33,25 ± 0,69	20,36 ± 0,02	5,87 ± 0,03	1,03 ± 0,18
Reins	17,21 ± 0,9	30,56 ± 0,36	25,63 ± 0,85	18,99 ± 0,07	15,77 ± 0,51	1,03 ± 0,29
Estomac	0,01 ± 0,01	0,09 ± 0,52	5,69 ± 0,01	15,25 ± 0,01	6,35 ± 0,01	0,01 ± 0,5
Poumons	8,97 ± 0,52	20,68 ± 0,9	15,88 ± 0,25	10,24 ± 0,02	5,62 ± 0,23	0,06 ± 0,12
Cœur	25,29 ± 0,75	18,36 ± 1,3	16,34 ± 0,14	11,22 ± 0,01	5,02 ± 0,62	0,13 ± 0,05
Cerveau	0,01 ± 0,01	0,09 ± 0,58	0,1 ± 0,01	0,01 ± 0,01	0,01 ± 0,01	0,01 ± 0,01
Muscle	0,1 ± 0,25	0,21 ± 0,71	2,25 ± 0,21	0,28 ± 0,01	0,03 ± 0,01	0,01 ± 0,01
Os	0,12 ± 0,21	1,69 ± 0,64	7,28 ± 0,01	0,65 ± 0,27	0,01 ± 0,02	0,01 ± 0,01
Site d'injection	1,98 ± 0,02	1,23 ± 0,61	0,1 ± 0,01	0,02 ± 0,01	0,01 ± 0,01	0,01 ± 0,15

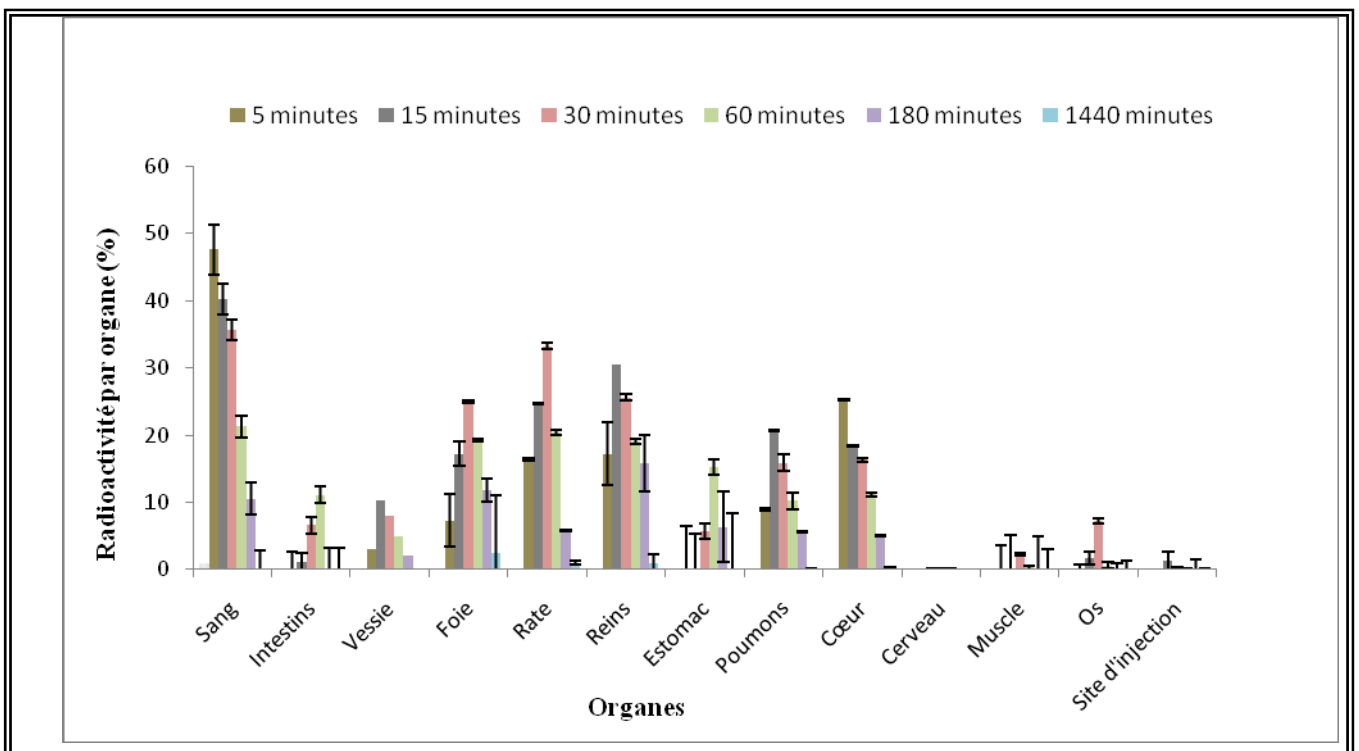


Figure 32 : Etude de la cinétique de distribution du venin de Bot-^{99m}Tc chez la souris envenimée par voie intraveineuse avec une dose sublétales .(n=3)

II-3) BIODISTRIBUTION PAR SCINTIGRAPHIE :

L'étude scintigraphique des venins technétiés d'Aah et de Bot chez le rat, a été réalisée sur gamma caméra. (Figure 33)

Le rat a reçu par voie intraveineuse des doses sublétales des venins d' Aah ou de Bot, puis a été soumis au jeun pendant des temps post-injection, pour être euthanasié au moment venu, aux vapeurs d'éther, selon une cinétique allant de 5 minutes à 1440 minutes.

L'image scintigraphique des rats soumis à une administration des mêmes doses du kit MDP technétié, dans les mêmes conditions d'injection et d'euthanasie, confirme la fixation osseuse traduite par la captation du kit médrionate par les os au niveau de la boite crânienne, de la colonne vertébrale et des articulations. Son élimination est exclusivement rénale, puisque seuls les reins et la vessie apparaissent sur le cliché.

Aucune activité n'est signalée au niveau de la thyroïde, laissant conclure l'absence de technétium libre dans le venin radiomarqué.

L'étude de la biodistribution par l'imagerie révèle, une fixation intense et prolongée des venins dans le foie, les poumons, et les reins. Cette concentration d'activité diminue progressivement pour disparaître à 1440 minutes post-injection.

Les traceurs étant métabolisés et éliminés essentiellement par voie rénale, leur fixation, au niveau des reins, persiste au-delà des 1440 minutes post-injection, confirmant ainsi la lenteur dans leur élimination de l'organisme.

Ces résultats sont comparables à ceux obtenus par Murugesan et collaborateurs (1999), lors de l'étude de la biodistribution du venin du scorpion *Mesobuthus tamulus concanesis pocock*, indiquant encore une fois, que la cinétique de distribution et d'élimination des venins scorpioniques est rapide .

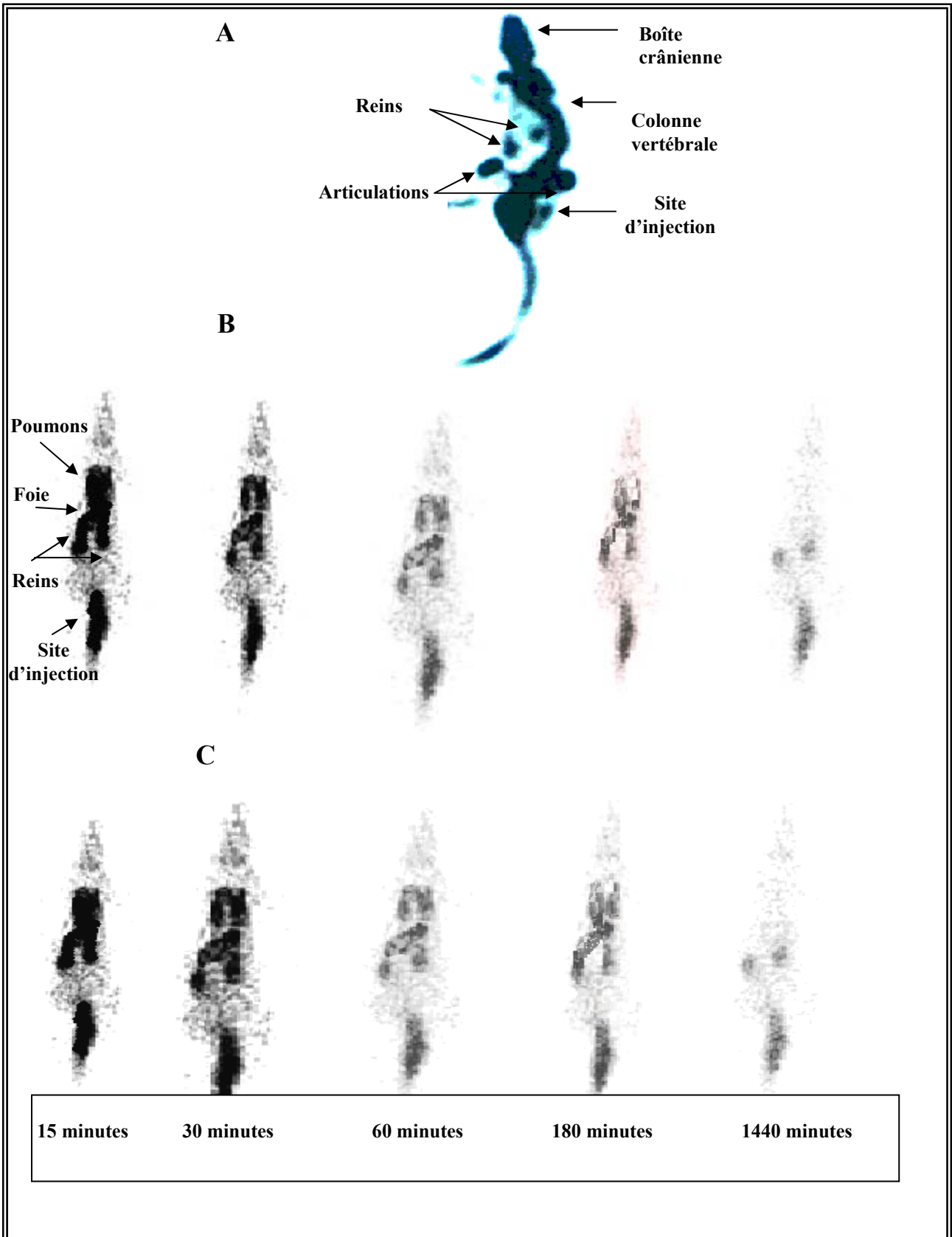


Figure 32 : Images scintigraphiques de la biodistribution du kit MDP (A) et des venins technétiés, d'Aah (B) et de Bot(C), chez le rat envenimé par voie intraveineuse avec des doses sublétales, et sacrifiés après des temps post-injection de 15, 30, 60, 180 et, 1440 minutes .

DISCUSSION GENERALE

DISCUSSION GENERALE

La première partie des présents travaux a porté sur l'application de la technologie des hybridomes, pour la production d'anticorps monoclonaux dirigés contre la toxine III du venin de *Buthus occitanus tunetanus*. Les anticorps monoclonaux représentent des outils d'investigation des envenimations scorpioniques, et des modèles de base pour la conception de nouvelles molécules améliorées par les techniques de l'ingénierie moléculaire.

Plusieurs approches ont été proposées et appliquées, pour l'obtention d'une réponse meilleure vis-à-vis des toxines scorpioniques. L'utilisation de protéines porteuses de poids moléculaire élevé (BSA, analogue synthétique non-toxique de la toxine), couplées à l'antigène d'intérêt (Clot-Faybesse *et al.* 1999), ou la détoxification des toxines par polymérisation au glutaraldhyde (Devaux *et al.*, 2002) . Ces procédés ont fait l'objet d'une voie alternative, pour l'amélioration des réponses immunitaires induites chez le modèle murin. Puisque la non-réponse aux agents immunogènes, est un phénomène qui n'est pas observé chez le lapin. Bien au contraire, les antisérums issus de l'immunisation de lapin contre les toxines scorpioniques sont de haute qualité, présentant même des titres élevés en anticorps polyclonaux.

Le protocole d'immunisation adopté dans cette étude, a été appliqué par Bahraoui, lors de ses essais de production d'anticorps monoclonaux anti-Aah II, et est basé sur l'immunisation à court terme, par voie s.c, de souris Balb/c avec de faibles doses de la toxine sous sa forme native. (Bahraoui *et al.* 1988). Les antisérums murins obtenus ont été caractérisés pour leur titre en anticorps par les tests ELISA et RIA simples, et est de l'ordre de 12 000. Ce titre est en faveur d'une hybridation cellulaire entre lymphocytes B induits et myélomes SP2 maintenus en culture, pendant une semaine en amont de l'éventuelle fusion.

Des titres moins élevés en anticorps anti-Aah III, de l'ordre de 10 000, ont été obtenus lors des travaux de développement d'hybridomes murins effectués par Devaux et ses collaborateurs (donnée non publiée), contrairement à ceux développés, avec la même toxine, chez le modèle lapin, et qui sont beaucoup plus élevés et de qualité meilleure.

Les hybridomes ont été produits par la fusion de cellules myélomateuses SP2 et de lymphocytes B immergés dans la population lymphatique isolée par le Ficoll, ou dans les splénocytes totaux extraits de la rate de souris immunisées. L'hybridation cellulaire peut avoir lieu spontanément par simple contact direct des cellules parentales dans certaines conditions externes de température et de pH du milieu, la fréquence d'une telle fusion spontanée est très faible et toujours imprévisible, ou en présence d'agents, dit fusogènes (le virus Sendai, myxovirus, la lysolecithine et le PEG), dans ce cas, la fusion est plus maîtrisée. Pour notre part nous avons utilisé le polyéthylène glycol 1 500 comme agent de fusion.

Le nombre d'hybridomes obtenu découle de la fréquence de formation des hétérocaryons, dont les probabilités ont été augmentées par l'isolement de la population lymphatique des cellules spléniques totales, et par leur mise en contact direct avec les myélomes à un rapport de (10 :1). A ce stade de la fusion, les membranes des cellules parentales sont fragilisées, facilitant ainsi le brassage de leur matériel, pour la formation des hétérocaryons, dont seuls les binucléés seront capables de se multiplier. Encore faut-il que, les deux noyaux de l'hétérocaryon arrivent en mitose en même temps afin d'obtenir la formation d'un fuseau unique avec alignement de tous les chromosomes sur la même plaque équatoriale.

Les deux cellules filles qui en sont issues seront mononuclées et leur noyau unique contiendra tous les chromosomes des deux cellules parentales.

La sélection des hybridomes a été effectuée dans une culture mixte, selon la technique de LITTLEFIELD J.W (1964), basée sur l'emploi d'un milieu sélectif, connu sous le nom du milieu HAT, et dont le principe est le shunt de la voie endogène de synthèse des nucléotides par l'aminoptérine présente dans le milieu sélectif. Ceci favorise le développement unique des cellules hybrides dotées de l'enzyme HGPRT. Les composants du milieu sélectif sont supprimés progressivement du milieu de culture, et les cellules hybrides, étant de nature fragile et délicate, sont minutieusement maintenues en culture par apport continu de cytokines et de facteurs de croissance présents dans l'additif HES, et par un apport supplémentaire de macrophages, en guise de cellules nourricières et détergentes, issues du péritoine de souris.

Les hybridomes les plus stables, producteurs des anticorps anti-Bot III, ont été amplifiés et clonés dans un milieu de culture enrichi en facteurs de croissance. La technique ELISA, par sa sensibilité et sa reproductibilité, a été utilisée pour le screening des surnageants des cultures stables d'hybridomes.

Les résultats obtenus indiquent que la technique de fusion mettant en jeu, la population lymphocytaire isolée et les cellules de myélomes, appliquée dans notre travail, en présence de cellules nourricières, est plus efficace que les autres fusions évoquées plus haut. Des meilleurs rendements de fusion ont été obtenus avec cette technique. Toutefois, après expansions et amplifications des hybridomes, seuls quatre clones (2G7, 3B2 et 2D6, 3C9), ont été qualifiés de stables, pour leur résistance aux différentes étapes de culture.

Cependant une baisse progressive du pouvoir sécrétoire des clones stables, est observée au fur et à mesure de leur amplification. Ce qui peut être expliqué soit par la lenteur de leur croissance influençant négativement sur leur fonction sécrétrice, ou par la grande instabilité chromosomique conduisant à la perte d'une partie du patrimoine génétique contenant les loci codant pour les chaînes légères et lourdes des anticorps (Theillaud ; 2005), au cours des divisions, ou bien par la faible affinité des anticorps sécrétés et qui se traduit par une faible détection par les tests biochimiques. (Bazin ; 1985)

La deuxième partie des présents travaux a consisté à étudier la cinétique de distribution des venins de scorpions les plus redoutés en Algérie, à savoir : *Androconus australis hector* et *Buthus occitanus tunetanus*, *in vivo*, après radiomarquage. La détermination des paramètres toxicocinétiques d'un venin, permet d'établir les bases d'une approche plus rationnelle du traitement des envenimations scorpioniques, afin d'optimiser son application.

Plusieurs travaux expérimentaux ont été menés pour la détermination des caractéristiques pharmacocinétiques des venins, injectés par différentes voies (s.c, i.v, i.m), sur modèles animaux variés, ayant recours pour la quantification des composants du venin, au test ELISA ou à la mesure de la radioactivité accumulée par organe. (Ismail *et al.*, 1975 et, 1980 ; Ismail et Abd-Essalem, 1988 et, 1998; Revelo *et al.*, 1996; Santana *et al.*, 1996; Krifi *et al.*, 2001 et 2002, Bessalem *et al.*, 2002, Hammoudi-Triki *et al.*, 2003).

En revanche, lors d'une étude comparative de la biodistribution des venins quantifiés par les deux méthodes évoquées, de sensibles différences ont été observées quant aux profils cinétiques, et valeurs de certains paramètres pharmacocinétiques des venins. En effet, le signal radioactif émanant de l'échantillon mesuré, est relatif à la radioactivité totale émise par les composants du venin, simultanément dans leurs formes libre et liée aux récepteurs spécifiques.

Krifi et ses collaborateurs (2001) expliquent à travers leurs travaux qu'un éventuel métabolisme du venin se produisant *in vivo*, peut être à l'origine de la surestimation des paramètres mesurés, puisque la radioactivité détectée comptabilise au même titre les formes native et métabolisée des composants du venin. Plus tard, Devaux et ses collaborateurs (2004) contournent cette problématique, par l'application parallèle des tests hautement spécifiques RIA compétitif et ELISA sandwich, en utilisant respectivement des anticorps polyclonaux et monoclonaux spécifiques à chaque toxine étudiée sous sa forme native, afin d'éviter toute possibilité de réactions croisées, qu'elles soient avec les métabolites issus de la dégradation *in vivo*, ou avec les toxines appartenant au même groupe immunologique que celle étudiée.

Le radiomarquage des protéines a débuté en 1970 ; les anticorps monoclonaux pour la détection de tumeurs, les hormones pour le diagnostic de certaines pathologies (Thorell J.I., et Johansson B.G. 1971), puis la synthèse de nouveaux ligands pour la biologie nucléaire s'est orientée vers des structures peptidiques; telles que toxines, et fractions immunoglobuliniques (Rochat.H. *et al.* 1979 et 1979, Ismail M. *et al.* 1975, 1980, 1982 et 1997, El Ayeb M. *et al.* 1983, Bahraoui E. *et al.* 1985, Devaux C. *et al.* 2004, Krifi M.N. *et al.* 2005).

Initialement, le marquage était réalisé à l'iode radioactif; par l'adaptation de différentes méthodes : oxydation à la lactoperoxydase ou à la chloramine-T, ou encore dans une cellule électrolytique ; cependant le développement de nouveaux chélates fonctionnels a permis la synthèse de traceurs organométalliques. La recherche préférentielle de ces traceurs organométalliques marqués à l'indium (^{111}In), au technétium ($^{99\text{m}}\text{Tc}$), au cuivre (^{64}Cu ou ^{67}Cu), à l'yttrium (^{90}Y) ou au rhénium (^{186}Re ou ^{188}Re) vient essentiellement d'un rapport signal/bruit de fond meilleur par rapport aux traceurs iodés en raison d'une meilleure stabilité du marquage.

Depuis quelques années, de nombreux peptides marqués au technétium ont été développés par bien des méthodes : réduction des ponts disulfure de la protéine par les ions d'étain ou autres agents chimiques tels que le 2-mercaptoethanol ou l'acide ascorbique, ou bien par incorporation de chélateurs bi fonctionnels (Schwarz A. *et al.* 1987, Murugesan *et al.* 1999).

Excepté pour les isotopes utilisés tels quels, l'étape de marquage est l'étape prépondérante de la préparation du traceur, et les difficultés à surmonter sont nombreuses. En effet, il est question de synthétiser des molécules marquées chimiquement et radiochimiquement pures, qui ne sont pas métabolisées *in vivo* avec une fixation de l'isotope à la molécule jusqu'à son élimination ou jusqu'à sa décroissance dans la cible, spécifiques d'un organe ou d'une fonction, qui se fixent avec une bonne affinité sur leur cible, et qui sont rapidement éliminées de la circulation sanguine.

Deux stratégies sont appliquées, pour marquer une molécule sans la dénaturer, que ce soit pour un marquage à l'iode ou au technétium 99m : la fixation de l'isotope directement sur une molécule vectrice, ou l'utilisation de chélateurs bi fonctionnels comportant les groupements mis en jeu.

La fixation de l'iode au substrat organique modifie peu la structure de la molécule du fait de son faible encombrement stérique (par rapport à l'association chélate-isotope), il est utilisé essentiellement pour le marquage de petites molécules et des ligands de récepteur afin de limiter les interactions avec les sites de reconnaissance et les modifications des propriétés pharmacocinétiques de la molécule biologique. Le marquage à l'iode des peptides et des protéines permet de produire un traceur de haute activité spécifique. Cette caractéristique est nécessaire pour l'étude de voies métaboliques, l'étude de la liaison des ligands aux récepteurs ou les mesures physiologiques quantitatives. La radioiodation des peptides est donc une méthode de choix en recherche.

De nombreuses stratégies ont été développées pour marquer les peptides au technétium 99m. Cependant, la méthode de marquage peut avoir un effet important sur la biodistribution de la molécule surtout pour les petits peptides. L'encombrement stérique peut modifier de façon plus ou moins importante la structure de la molécule, chaque ligand possédant des propriétés qui lui sont propres. Ces deux facteurs peuvent modifier les propriétés physico-chimiques et biologiques des molécules marquées. Il est donc nécessaire de choisir le synthon en fonction de ses propriétés intrinsèques et en fonction de la molécule à marquer.

La réaction de marquage doit être définie et contrôlée afin de préparer une molécule avec une bonne activité spécifique. Elle doit présenter un bon rendement de marquage et la pureté radiochimique de la molécule active doit être supérieure, si possible, à 90% afin d'éviter une étape de purification supplémentaire difficilement réalisable en routine au laboratoire.

L'évaluation des peptides radiomarqués, appelés ainsi traceurs, permet, après étude de leur biodistribution chez l'animal, d'aider à une meilleure compréhension de leur comportement *in vivo*. Après avoir défini les conditions de marquage, il est nécessaire d'étudier le métabolisme de cette molécule et notamment la stabilité du marquage.

L'iode est un bon groupe partant, il s'échange rapidement avec les halogènes en excès, notamment les atomes de chlore présents dans les solutés physiologiques. *In vivo*, la présence de désiodases, enzymes essentielles au métabolisme des hormones thyroïdiennes, conduit souvent à une désiodation de l'iode fixé sur une tyrosine et par analogie structurale sur le cycle aromatique de nombreuses molécules.

Le métal, quant à lui, est lié au chélate par des liaisons non covalentes, la stabilité du chélate va être fonction de la stabilité cinétique et thermodynamique du complexe, et donc de la nature des atomes donneurs, du nombre et de la structure du chélate. *In vivo*, certains acides aminés sont des chélateurs du technétium 99m comme la cystéine, et une démétallation du traceur est toujours possible.

Les traceurs évalués dans ces travaux, sont les venins ou les toxines de scorpions. Ces peptides ont été radiomarqués à l'iode ou au technétium 99m par des méthodes susceptibles d'être utilisées en routine, et qui permettent la formation de complexes marqués stables et

utilisables chez l'animal. Les traceurs doivent présenter des propriétés pharmacocinétiques compatibles avec une utilisation *in vivo* (clairance sanguine rapide, élimination urinaire, temps de diffusion vers la cible compatible avec la demi-vie de l'isotope) ; les modifications chimiques introduites dans la molécule afin de faciliter le radiomarquage ne doivent pas modifier la spécificité du ligand pour son récepteur.

Dans le cas des toxines Aah II et Bot III, la présence de 7 résidus tyrosine dans la chaîne peptidique a porté notre choix vers un marquage à l'iode par substitution électrophile de l'acide aminé aromatique. De ce fait, aucune modification n'est apportée à la molécule biologiquement active (peptide froid) susceptible d'altérer la structure conformationnelle, et donc l'activité biologique.

Le marquage au technétium est réalisé à l'aide d'un petit synthon en cours de validation sous forme de kit : Kit MDP, dans le laboratoire des radio-isotopes du Centre de Recherche Nucléaire de Draria . Ce kit sert de ligand et permet donc la formation d'un complexe métallique stable avec le peptide d'intérêt. Sa stabilité doit être importante en raison de la présence de ligands donneurs en excès dans le sérum.

Le marquage à l'iode des peptides Aah II et Bot III est réalisé par substitution électrophile sur le résidu tyrosine naturellement présent dans la biomolécule. La réaction d'iodation est rapide, elle dure une minute. La chloramine-T n'a induit aucune dégradation du peptide, révélée par les tests RIA effectués en aval de chaque procédure de marquage. Les paramètres de la réaction d'iodation : concentration en peptide et taux de chloramine-T, ont été optimisés afin d'obtenir une réaction complète et un marquage avec de bonnes activités spécifiques .

Ce radiomarquage est reproductible avec un bon rendement et une pureté radiochimique supérieure à 90%, et ne nécessite donc pas d'étape de purification. Les études de stabilité en milieu biologique réalisées *in vitro* montrent une désiodation faible et progressive des toxines au cours du temps, les PRC étant supérieures à 90% après 24 heures d'incubation à 37°C, dans le milieu biologique.

Les venins d'Aah et de Bot ont été complexés au technétium-99m par marquage direct. La réduction des ponts disulfure de la protéine effectuée par le 2-mercaptoethanol, permet la mise en évidence des groupements sulfhydryl libre mis en œuvre dans la complexation de la biomolécule au technétium, lui-même réduit et maintenu à l'état stable sous sa forme Tc(IV), à l'aide du kit MDP.

Le marquage au technétium-99m est spécifique, et a été effectué avec un bon rendement et une pureté radiochimique supérieure à 90%. La cinétique de complexation des venins est rapide reproductible, complète et stable, puisque aucune décomplexation (ni par libération du technétium, ni par perte du complexe technétié) n'a été observée après 24 heures d'incubation à 37°C (PRC \approx 90%), dans le milieu biologique. Les traceurs produits ainsi évalués ont été en faveur d'une étude de biodistribution *in vivo*.

Les résultats obtenus dans les présents travaux, ne révèlent pas de différences significatives dans la biodistribution des venins d'Aah et de Bot. Selon les profils cinétiques obtenus, les venins d'Aah et de Bot injectés par voie s.c, présentent une diffusion rapide à partir du site d'injection vers les compartiments vasculaire et tissulaires, puis qu'une faible

détection a été repérée au niveau du site d'injection au bout de 30 minutes de l'envenimation. Des concentrations maximales sont atteintes au bout de 30 minutes post-injection, au niveau sérique et cardiaque.

Les venins sont détectés dans les organes des souris envenimées, des concentrations maximales sont retrouvées dans un ordre décroissant d'abord au niveau des reins, puis du foie, des poumons, du cœur, de la rate, du muscle squelettique, de la vessie, et de l'estomac. Aucune trace des venins n'a été détectée dans le cerveau. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par Hammoudi-Triki et collaborateurs (2003 et 2007), Bessalem et collaborateurs (2002), ayant utilisé le test ELISA sandwich pour la quantification des venins .

Le passage des molécules à travers la barrière hémato-encéphalique et minutieusement conditionnée par son imperméabilité sélective. Les venins d'Aah et de Bot demeurent détectables au niveau du foie et des reins à 1440 minutes post-injection, traduisant une élimination lente de leurs composants. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par Ismail et Abd Essalam (1988) et , Santana et collaborateurs (1996), ayant utilisé la mesure du signal radioactif accumulé par organe pour la quantification des venins *in vivo*.

L'étude de la cinétique de distribution des toxines III et II respectivement des venins de Bot et d'Aah, révèle bien des différences, quant au comportement *in vivo* ,par rapport à celui de leurs venins bruts respectifs. Ces neurotoxines présentent une biodistribution identique , expliquée par leur appartenance au même groupe structural et immunologique.

Il a été constaté, dans les présents travaux, que les activités sériques et tissulaires mesurés d'Aah II-¹²⁵I sont d'une importance légèrement supérieure à celles de Bot III-¹²⁵I . Ceci pourrait être expliqué par les plus hautes toxicités et affinité d'Aah II vis à vis de ses récepteurs spécifiques par rapport à Bot III. (Gordon et al. 1996). En effet il a été démontré que la séquence peptidique de Bot III diffère de celle d'Aah II par seulement trois substitutions en résidus d'acides aminés, et qui semblent être responsables de la haute toxicité d'Aah II par rapport à Bot III : la valine en position 10 d'Aah II est remplacée par l'arginine de Bot III, la leucine en position 51 d'Aah II est remplacée par la valine de Bot III et, l'histidine en position 64 d'Aah II est remplacée par l'asparagine de Bot III (Fontecilla-Camps et al.,1980 et 1982) .

Les résultats obtenus , montrent une rapidité de diffusion des toxines du site d'injection vers les compartiments vasculaire et tissulaires, soit encore plus marquée par rapport à celle des venins bruts. Une activité sérique maximale est détectée à 30 minutes post-injection, qui diminue progressivement de moitié au bout de 180 minutes post-injection. Les toxines présentent une large distribution dans l'organisme des souris envenimées, des activités maximales sont retrouvées, en premier lieu, au niveau de l'estomac, puis du muscle squelettique, du foie, des reins, des intestins, des os, des poumons, de la rate, et enfin du cœur.

Cependant l'intensité du signal radioactif au niveau de ces organes, est nettement plus inférieure que celui détecté pour les venins bruts, ceci mène à conclure que les toxines sont indirectement responsables des conséquences physiopathologiques et tissulaires graves observées dans les organes des souris envenimées. Aucune activité n'a été détectée au niveau cérébral.

Une accumulation maximale des toxines au niveau des reins et du foie, est détectée à 30 minutes d'envenimation, laissant conclure que leur élimination est rénale et que leur métabolisme s'opère au niveau hépatique. Ceci est confirmé par la fixation prolongée des toxines, dans ces organes d'élimination, au-delà de 180 minutes post-injection, et par l'apparition de l'activité radioactive au niveau intestinal, atteignant un maximum à 180 minutes post-injection. Cependant les activités fortes et prolongées des toxines détectées au-delà de 180 minutes, dans le muscle squelettique, l'estomac, l'os, les reins, les poumons et le foie, sont interprétées selon Devaux et collaborateurs (2004) soit, par la très haute affinité de ces toxines pour leurs récepteurs spécifiques, ou à leur liaison non-spécifique aux surfaces biologiques rencontrées, due à leur nature hautement hydrophobique. Ces deux hypothèses pourraient alors expliquer la disparition rapide des toxines du compartiment vasculaire, par rapport à celle des venins bruts.

Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par Devaux et ses collaborateurs (2004), lors de l'étude de biodistribution du venin d'Aah injecté par voie s.c chez la souris et le lapin, utilisant le test RIA compétitif pour la quantification de ses toxines I, II, et III. Les conclusions en tirées à travers leur étude sont comparables avec ceux obtenus dans les présents travaux, à savoir ; la rapidité de diffusion et de distribution des toxines , notamment Aah II, avec une concentration sérique maximale atteinte à 26 ± 10 minutes, qui s'annule au bout de 180 minutes post-injection, et une rapidité d'élimination estimée à 6 fois plus élevée que celle du venin brut, laissant conclure, que l'étude de biodistribution des venins totaux ne reflète en aucun cas celle des neurotoxines létales. (Devaux *et al.* 2004)

Lorsque l'envenimation est réalisée par voie i.v, les venins technétiés présentent des cinétiques de biodistribution identiques, mais à des intensités différentes. Le venin d'Aah, qui malgré sa faible dose injectée, se manifeste de façon plus intense dans le sang et les tissus, par rapport au venin de Bot. La diffusion tissulaire des venins à partir du sang, est très rapide, et a lieu dès les premières 5 minutes de leur injection ; puisque plus de 80% de l'activité injectée disparaît du compartiment vasculaire au bout de 60 minutes post-injection pour le venin d'Aah et, 180 minutes post-injection pour le venin de Bot . D'importantes activités sont détectées précocement au niveau des tissus les plus irrigués de l'organisme, à noter en premier lieu et successivement : le cœur ; les reins ; la rate ; le foie et, les poumons.

Les activités maximales rénales et pulmonaires sont atteintes à 15 minutes post-injection, et plus tardivement à 30 minutes post-injection pour celles du foie et de la rate. L'élimination des venins est relativement lente, et se fait par les voies rénale et hépatobiliaire, puisque des activités considérables sont observées, à partir des premières minutes de l'envenimation, au niveau du rein, du foie et de la vessie.

Cette voie d'injection a été explorée dans plusieurs travaux antérieurs, pour différents venins scorpioniques (Bot, Aah, Aag) : Krifi *et al.*, 2001 et 2005 ; Devaux *et al.*, 2004 qui, de par leurs travaux d'optimisation de l'immunothérapie antivenin, et d'étude des toxico cinétiques des venins et de leurs toxines, sur différents modèles animaux , convergent vers les mêmes conclusions de distribution des venins et de leurs toxines, à savoir des cinétiques rapides de distribution ($t_{1/2\alpha}$ moyen = 5,5 minutes, $t_{1/2\gamma}$ moyen = 144,5 minutes).

L'étude de la biodistribution des venins technétiés Bot et Aah, injectés par voie intraveineuse, a été complétée par l'imagerie scintigraphique, afin d'établir une corrélation

entre les résultats obtenus par dissection d'animaux et ceux obtenus par détection externe sur gamma camera.

L'étude de la biodistribution par l'imagerie révèle, une fixation intense et prolongée des venins dans les foie, poumons, et reins. Cette concentration d'activité diminue progressivement pour disparaître à 1440 minutes post-injection. Les traceurs étant métabolisés et éliminés essentiellement par voie rénale, leur fixation, au niveau des reins, persiste au-delà des 1440 minutes post-injection, confirmant ainsi la lenteur dans l'élimination du venin de l'organisme des animaux envenimés.

Aucune activité n'est signalée au niveau de la thyroïde, laissant conclure l'absence de technétium libre dans le venin radio marqué. Ces résultats sont comparables à ceux obtenus par Murugesan *et al.*, 1999, lors de l'étude de la bio distribution du venin de *Mesobuthus tamulus concanesis pocock*, confirmant encore une fois, la rapidité des cinétiques de distribution des venins scorpioniques.

Toutes les études antérieures de biodistribution menées sur les venins scorpioniques, déversent sur les mêmes constatations ; traduisant une rapidité d'absorption des composants du venin du site d'injection vers les compartiments vasculaire et tissulaires, et une large distribution dans l'organisme, suivie d'une élimination rénale rapide. (Ismail *et al.*, 1983, Pépin-Covatta *et al.*, 1996, Krifi *et al.*, 2002, El Hafny *et al.*, 2002). Ce qui est en parfaite concordance avec le tableau symptomatologique établi par les cliniciens, quant à l'apparition rapide des signes d'envenimation chez les victimes de piqûre accidentelle par le scorpion . Ce qui laisse présager la nécessité de l'application précoce du traitement antivenimeux, administré par la bonne voie et, dans les conditions requises aux victimes.

Les toxicocinétiques de distribution des venins de scorpion diffèrent considérablement, selon la voie d'injection, chez le même modèle expérimental. L'envenimation de souris par voie s.c, avec le venin de scorpion Ts , a montré une absorption maximale des venins au bout de 2 heures post-injection, et une rapidité de diffusion dans les compartiments tissulaires. Des concentrations maximales du venin ont été déterminées par ELISA sandwich, au niveau rénal et hépatique après 15 minutes d'envenimation, pour être ensuite distribué 30 minutes après envenimation dans le cœur, les poumons et la rate.

L'élimination du venin a été détectée au bout de 8 heures de son injection, pour atteindre des niveaux inférieurs au seuil de détection du test ELISA sandwich. (Revelo *et al.*, 1996) Aucune détection du venin n'a été signalée au niveau du centre nerveux central ; La barrière hémato-encéphalique est imperméable aux composants du venin. (Clot-Faybesse *et al.*, 2001)

Les expériences de toxicocinétique réalisées sur différents modèles animaux (souris, rat, cobaye, lapin), avec des venins de scorpion radiomarqués, ont montré des différences dans les valeurs de certains paramètres cinétiques par rapport à celles obtenues avec les venins natifs dosés par ELISA. (Ismail *et al.*, 1988 et 1998, Krifi *et al.*, 2005, Devaux *et al.*, 2004) Ces études ont été réalisées avec les venins d'*A amoreuxi* et de sa fraction toxique, de Lqq, de *Buthotus judaicus*, d'Aag et de Aah. L'injection de ces venins par voie i.v , aboutit à une résorption maximale de la radioactivité estimée entre 70 et 80% de la radioactivité injectée.

Les demi-vies de distribution et d'élimination ont été estimées respectivement à 4 à 7 minutes et 4,2 à 13,7 heures. Le venin diffuse très rapidement dans un grand volume de

distribution. Le temps de demi-vie d'élimination, le temps de résidence moyen dans l'organisme et le temps de résidence moyen dans les compartiments périphériques ont été estimés respectivement à 24 heures, 34 heures et 26 heures, indiquant une très faible vitesse d'élimination du venin injectée par cette voie. (Ismail *et al.*, 1988 et 1998)

L'analyse de la toxicocinétique du venin d'Aah chez le rat montre une élimination rapide des toxines du venin à partir de leur site d'injection avec une demi-vie d'élimination de 11 min par voie i.v. et 35 à 55 min après injection par voie s.c. Les études réalisées sur les envenimations scorpioniques rapportent des demi-vies d'élimination de venin très variables, pouvant aller de 12 à 24 heures (Ismail *et al.* 1983 ; Pépin-Covatta *et al.* 1996; Krifi *et al.*, 2001 ; E1-Hafny *et al.*, 2002). Une telle variation dans les délais d'élimination du venin peut être expliquée par les différences d'utilisation des modèles animaux (Lapin, souris) et/ou par les méthodes de détection du venin.

La résorption du venin d'Aah est quasi-totale et le maximum de concentration de venin est atteint 30 à 40 min après injection s.c. L'absorption rapide du venin d'Aah corrobore avec l'apparition précoce du dysfonctionnement physiologique et les cas de mortalité observés surtout chez les enfants. En outre, la toxicocinétique du venin d'Aah diffère en fonction des voies d'injection du venin (i.v ou s.c).

En effet, lorsque l'envenimation est réalisée par voie i.v, le venin présente un volume de distribution similaire à celui du fluide extracellulaire, par contre, par voie s.c, une distribution élevée des toxines est observée dans le compartiment extravasculaire. Une large distribution des venins de scorpions après injection par voie s.c. a été également observée par Pépin-Covata *et al.* (1996) et Krifi *et al.* (2001) respectivement pour les venins de Bom et de Bot.

L'étendue de la distribution d'une toxine est contrôlée par sa liaison aux protéines plasmatiques circulantes et stationnaires, ce qui pourrait être une explication au petit volume de distribution des toxines injectées par voie i.v, tandis que l'injection par voie s.c. provoquerait leur distribution de la lymphe vers leur récepteur spécifique.

Par ailleurs, les résultats des expériences de biodistribution des toxines circulantes dans les différents compartiments vasculaire et tissulaires après envenimation par le venin d'Aah montrent une concentration de venin déterminée par le test ELISA, plus importante dans le sang, cœur, poumon, foie et reins.

L'accumulation de ces toxines notamment dans les tissus hépatiques et rénaux pourrait traduire d'une part, une insuffisance des systèmes de clairance des toxines, qui représentent les principaux systèmes d'élimination des toxines de l'organisme et d'autre part. à la présence de récepteurs spécifiques, de hautes affinités pour les composés neurotoxiques, notamment au niveau des reins (Ismail et Abd-Essalem, 1988 ; Revelo *et al.* 1996).

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

CONCLUSION GENERALE

Cette étude avait eu pour objectifs ; une contribution à l'optimisation du traitement spécifique des envenimations scorpioniques, par la production d'anticorps monoclonaux purifiés dirigés contre la toxine III du venin de *Buthus occitanus tunetanus* (Bot III) ; et une meilleure compréhension de la cinétique de distribution des venins de *Buthus occitanus tunetanus* et *Androctonus australis hector* et de leurs principales toxines (Bot III et Aah II) *in vivo*, pour une meilleure application thérapeutique.

L'essai de production d'anticorps monoclonaux réalisé dans la première partie de ces travaux avait eu pour but ; une utilisation thérapeutique directe de l'anticorps monoclonal dirigé contre la toxine Bot III. Les hybridomes producteurs d'anticorps monoclonaux anti-Bot III, ont été obtenus au cours de ces travaux. Cependant, les étapes de purification et de caractérisation des anticorps monoclonaux anti-Bot III secrétés ont du être interrompues suite à la diminution soudaine du pouvoir sécrétoire des cellules hybrides au fur et à mesure des expansions clonales. Ceci pourrait être expliqué soit par l'instabilité chromosomique des hybridomes, interprétée par une perte des fonctions ou d'expression de certaines molécules, soit par la faible affinité des anticorps secrétés, réagissant alors faiblement aux tests biochimiques lors du screening des surnageants.

Dans la deuxième partie de ces travaux, deux techniques de radiomarquage des biomolécules d'intérêt ont été explorées, ayant recours aux deux isotopes les plus couramment usités dans le diagnostic *in vivo* en biologie et en clinique, à savoir l'iode 125 et le technétium 99m. Les traceurs obtenus étaient de qualité radiochimique satisfaisante présentant des activités spécifiques et une stabilité dans le milieu biologique, ce qui était en faveur d'une étude de cinétique de distribution des molécules radiomarquées *in vivo*.

Les résultats de l'étude pharmacotoxicologique des biomolécules radiomarquées, confirment la rapidité des cinétiques de distribution et d'élimination des venins scorpioniques dans l'organisme, déjà cités dans les travaux antérieurs. La toxicocinétique des venins de Bot et d'Aah, administrés par les voies sous-cutanée et intraveineuse, est comparable avec une intensité plus prononcée pour le venin d'Aah, puisque les délais d'atteinte dans les mêmes organes cibles sont identiques, avec une accumulation organique plus intense signalée pour le venin d'Aah par l'imagerie scintigraphique. Les cibles majeures révélées après une administration sous-cutanée du venin sont le cœur, le foie, les reins et les poumons, avec une fixation splénique intense au même titre que le foie, observée dans le cas d'une administration intraveineuse.

Des différences ont été observées lors de l'étude comparative de la toxicocinétique des venins de Bot et d'Aah par rapport à leurs principales toxines respectives Bot III et Aah II. En effet, en plus de leur élimination rénale qui s'est avérée moins rapide que celle des venins bruts, les toxines disparaissent rapidement du compartiment vasculaire pour une faible réapparition au niveau des organes cibles du venin total, à savoir : le cœur, les poumons et le foie. Ces neurotoxines sembleraient être indirectement impliquées dans les préjudices cardiaques, pulmonaires ou hépatiques des envenimés.

PERSPECTIVES

En complément des travaux réalisés, il serait indiqué de :

- Etablir un calendrier d'immunisation de souris adapté à la toxine III du scorpion de Bot, pour la production d'anticorps monoclonaux ;
- Mettre au point, et valider les techniques de radiomarquage des venins, toxines , et fragments d'anticorps : iodation à la chloramine-T, et complexation au ^{99m}Tc ;
- Contrôler les traceurs par HPLC ;
- Etudier la pharmacotoxicologie, *in vivo*, des venins et toxines radiomarqués à l'iode 125 et au technétium 99m, après immunothérapie, par dissection d'animaux et par imagerie scintigraphique;
- Etudier la pharmacocinétique des anticorps et de leurs fragments F(ab)'_2 et Fab radiomarqués, par dissection d'animaux et par imagerie scintigraphique.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abroug F., El Atrous S., Nouira S., Touzi N., and Bouchoucha S. 1999.** Serotherapy in scorpion envenoming : a randomized controlled trial. *Lancet* **354** : 906-909.
- Adam KR. ; Weiss C. 1959.** Scorpion Venom. *Z Tropenmed Parasitol.* **10** : 334-9.
- Apparu M., Madelmont J.C.** Molécules marquées à l'iode radioactif. Ln : Comet M., Vidal M. Radio pharmaceutiques –chimie des radio traceurs et applications biologiques. *Presse universitaire de Grenoble.* **1998.** 246-287.
- Bador R., Barbier Y., Bornet H., Chrier A., Charriere G. 1988.** Les immunodosages de la théorie à la pratique : immunodosages avec marqueurs radioactifs, *AcM 16-19.Ed. l'Acomem, lyon* : 83-106.
- Bador R., Barbier Y., Bornet H., Chrier A., Charriere G., Cohen H., Dechaud H., Grillet S., Hartman D., Krebs B., Lasne Y., Latapie M.J, Ville G. 1992.** Immunodosages de la théorie à la pratique. *Edition de l'Acomem*, pp 11-12, 16, 106.
- Bahraoui E., Pichon J., Muller JM. Darbon H., Elayeb M., Granier C., Marvaldi J., Rochat H. 1988.** Monoclonal antibodies to scorpion toxins : Characterization and molecular mechanisms of neutralization. *The journal of immunologie.* **141**: 214-220..
- BarskiG., Sorieul S. et, Cornefert F.** Production dans des cultures *in vivo* de deux souches cellulaires en association de cellules de caractères hybrides. *C.R. Acad Sci (Paris).* 1960, **251**, 1825-1827.
- Bazin H. 1985.** Hybridomes et anticorps monoclonaux. *Biofutur.* **44** : 14-17.
- Bessalem S., Hammoudi-triki D., Laraba-Djebari F. 2002.** Biodistribution de venin d' *Androctonus australis hector* et modifications histopathologiques du pancréas. *Toxines et Recherches Biomédicales, Editions Scientifiques et Médicales. Elsevier* : 235-242.
- Bolton A.E.** Comparative methods for the radiolabeling of peptides. **1986.** *Method.enzymol.***124**: 18-29.
- Bouhaouala-Zahar B., Ducancel F., Zenouaki I., Ben Khalifa R., Borchani L., Pelhate M., Boulain J.C., El Ayeb M., Menez A., and Karoui H. 1996.** A recombinant insect-specific alpha-toxin of *Buthus occitanus tunetanus* scorpion confers protection against homologous mammal toxins. *Eur.J.biochem.* **238** : 653-660.
- Bucherl W.** 1971. venomous animals and their venom. *Academic review* **3** : 375.
- Campbell A.M.** *Monoclonal antibody technology, Laboratory techniques.* Vol **13.** 1984.
- Catteral WA. 1980.** Pharmacologic properties of voltage-sensitive sodium channels in chick muscle fibers developing in vitro. *Dev Biol.* **78 (1)**: 222-30.
- Chatwal GS., Habermann E. 1981.** Neurotoxins, protease inhibitors and histamine releasers in the venom of the Indian red scorpion (*Buthus tamulus*) : isolation and partial characterization. **Toxicon** **19 (6)** : 807-23.
- Clot-Faybesse, O., Juin. M., Rochal, H., Devaux, C. 1999.** Monoclonal antihodies against the *Androctonus australis hector* scorpion neurotoxin I: characterisation and use for venom neutralisation. *FEBS Lett.* **458**: 313-318.
- Clot.Faybesse. O., Guieu, R., Rochat, H., Devaux, C., 2000.** Toxicity during early development of the mouse nervous system of a scorpion neurotoxins active on sodium channels. *Life Sci.* **6**: 185—192.
- Clot-Faybesse O., Devaux C. , Rochat H., Guieu R. 2001.** In vivo neurotoxicity of *Androctonus australis hector* scorpion venom: evidence that the supra-thoracic nervous system is not implicated in the clinical manifestations. *Toxicon* **39**: 1003-1007.

Cotton R.G.H et, Milstein C. Fusion of two immunoglobulin-producing myeloma cells. *Nature (London)*. **1973**, **244**. 42-43.

Darbon H. Zlotkin E., Kopeyan C., Rietschoten J., et Rochat H. 1982. Covalent structure of the insect toxin of the North African scorpion *Androctonus australis hector*. *Int.J .Pept.Protein.Res.***20** : 320-330.

De St. Groth, Scheidegger F and D. 1980. Production of monoclonal antibodies : Strategy and tactics. *J ; Immunol. Meth.* **35**. 1-21.

Delori P., Van-Rietschoten J.F., Rochat H. 1981. Scorpion venom and neurotoxins : an immunological study. *Toxicon* **19** (3) : 393-407.

Devaux C., Jouiroua B., Krifi M. N., Clot-Faybesse O., EI Ayeb M., Rochat H. 2004. Quantitative variability in the biodistribution and in toxinokinetic studies of the three main alpha toxins from the *Androctonus australis hector* scorpion venom. *Toxicon* **43**: 661-669.

Dewannjee M. The chemistry of technetium 99m labeled radiopharmaceuticals. *Semin.Nucl.Med.***1990**. **1**, 5-27.

Du Moulinet d'Hardemare A., Pasqualini R., Ridhe F., Vidal M. Chimie du technetium 99m. Ln : Comet M., Vidal M. Radio pharmaceutiques –chimie des radio traceurs et applications biologiques. *Presse universitaire de Grenoble.* **1998**. 153-180.

Edwards. R.P. 1985. Immunoassay. *Ed. William Heinmann Medical, London.*

El-Ayeb M., Delori P., Rochat H. 1983a. Immunochemistry of scorpion neurotoxin determination of antigenic site number and isolation of highly enriched antibody specific to a single antigenic site of toxin II of *Androctonus australis hector* molecular immunological. *Toxicon* **20**: 697-708.

El-Ayeb M., Delori P., Rochat H. 1983. Immunochemistry of scorpion alpha-toxins : antigenic homologies checked with radio-immunoassay (RIA). *Toxicon* **21** : 709-716.

El-Ayeb M., Rochat H. 1985. Polymorphism and quantitative variations of toxins in the venom of the scorpion *Androctonus australis hector*. *Toxicon* **23** : 755-760.

El-Ayeb M., Bahraoui EM., Garnier C., Novotny J., Fontecilla J., Fourquet P. The antigenic structure of alpha scorpion toxin. *Review molecular immunology.* **26**: 503-513.

El Hafny B., Chgoury F., Adil. N, Cohen N., Hassar M. 2002. Intraspecific variability and pharmacokinetic characteristics of Amm scorpion venom. *Toxicon* **40** (11): 1609-16.

Fontecilla-Camps JC., Almassy RJ. Suddath FL., Watt DD., Bugg CE. 1980. Three dimensional structure of a protein from a scorpion venom: a new structural class of neurotoxins. *Proc Natl Acad Sci USA.* **77** (11): 6496-500.

Fontecilla-Camps J.C., Almassy R.J., Suddath F.L, Walt D.D, Bugg C. 1981. Architecture of scorpion neurotoxins : a class of membrane-binding proteins. *TIBS* **6** : 291-296.

Fontecilla-Camps JC., Almassy RJ. Suddath FL., et Bugg CE. 1982. The Three dimensional structure of scorpion neurotoxins. *Toxicon.***20**(1): 1-7.

Fontecilla-Camps J.C., Hazersetter-Rochat C., Rochat H. 1988. Orthorhombic crystals and three-dimensional structure of the potent toxin III from the scorpion *Androctonus australis hector*. (Structure-function relationship/ sodium channel/ lysine reactivity/ x-ray crystallography) *.Proc.Nat.Acad.Sci.USA* **85** : 7443-7447.

Fougereau M. 1997. *Eléments d'immunologie fondamentale. Edition Masson.* pp 37.

Galfre G., Milstein C.et, Wright B. Nature, 277, 131. Galfre G., and Milstein C. 1981. Preparation of monoclonal antibodies : Strategies and procedures. *Methods enzymol.* **73** : 3-46.

- Gateau T, Bloom M, Clark R. 1994** . Response to specific *Centruroides sculpturatus* antivenom in 151 cases of scorpion stings. *J Toxicol Clin Toxicol.* **32 (2)** : 165-71.
- Genetet N.** *Immunologie*. Ed. Elsevier **4. 2003**. 767-775.
- Gilliland LK, Walsh LA, Frewin MR, Wise MP, Tone M, Hale G, Kiouisi D, Waldmann H. 1999**. Elimination of the immunogenicity of therapeutic antibodies. *J. Immunol.* **162** ; 3663-71.
- Goldsby RA., Kimbt TJ., Oriosme BA..2001**. Immunologie. Les cours de Janis Kuby. *Edition Dunod*.
- Gordon D., et Zlotkin E. 1993**. Binding of an alpha scorpion toxin to insect sodium channels is not dependant on membrane potential. *FEBS Lett.* **315.(2)**: 125-8.
- Gordon, D., Martin-Eauclaire, M.F.,Cestele, S., Kopeyan, C., Carlier, E., Khalifa, R.B., Pelhate, M., Rochat, H. 1996**. Scorpion toxins affecting sodium currents inactivation bind to distinct homologous receptor sites on rat brain and insect sodium channels. *J. Biol. Chem.* **271** : 8034—8045.
- Guerreau D., Saccavini J.C. macromolécules d'intérêt biologique marquées à l'iode**. Ln : Comet M., Vidal M. Radio pharmaceutiques –chimie des radio traceurs et applications biologiques. *Presse universitaire de Grenoble. 1998*. 350-364.
- Hammoudi-Triki D. et , Laraba-Djebari F. 2003**. Application of ELISA for the quantification of *Androctonus australis hector* venom in the envenomed serum of people and rats before and after immunotherapy. *Bull.Soc.Pathol Exot.* **96 (4)**: 297-301.
- Hammoudi-Triki D., Ferquiel E., Robbe-Vincent A., Bon C., Choumet V., and Laraba-Djebari F. 2004**. Epidemiological data, clinical admission gradation and biological quantification by ELISA of scorpion envenomations in Alegria : Effect of immunotherapy. *J. Royal Society of Tropical Medicine and hygiene* **98** : 240-250
- Hammoudi-Triki D., Lefort J., Rougeot C., Robbe-Vincent A., Bon C., Laraba-Djebari F., Choumet V. 2007**. Toxicokinetic and toxicodynamic analysis on *Androctonus australis hector* venom in rats: optimization and antivenom therapy. *Toxicol.appl.Pharmacol.* **218 (3)**: 205-14.
- Harlow ED., lane D. 1988**. Antibody. A laboratory manual : Immunisation; monoclonal antibody. *Cold spring Harbor Laboratory. USA.* 53-242
- Harlow ED., lane D. 1991**. *Anticorps : un manuel de laboratoire*. Edition : CSHL Press. pp **99**.103-150.
- Horibata K. et, Harris A .W. 1970**. Mouse myelomas and hybridomas in culture. *Exp. Cell. Res* ; **60**. 61-77.
- Hudson PJ, Kortt AA. 1999**. High avidity scFv multimers ; diabodies and triabodies. *J Immunol Methods.* **231 (1-2)** : 177-89.
- Hunter R., & Greenwood F.C. 1970**. Standardization of chloramines-T methods of proteins iodination. *Biol.Med.***133** : 989-992.
- Ismail M., El-Asmar MF., Osman OH. 1975**. Pharmacological studies with scorpion (*Palamneus gravimanus*) venom: evidence for the presence of histamine. *Toxicon* **13 (1)**: 49-56.
- Ismail M., Abdouallah M.E., Morad M.A., Ageel A.M. 1980**. Pharmacokinetic of ¹²⁵I-labelled venom from the scorpion *Androctonus australis* (*Aud. And Sav.*). *Toxicon* **18** : 301-308.
- Ismail M., Abd Elsalem M.A. 1988**. Are the toxicological effects of scorpion envenoming related to tissue concentration ?. *Toxicon* **26** : 233-256.
- Ismail M., Fatani A.J.Y and Dbees T.T. 1992**. Experimental treatment protocols for scorpion envenoming : a review of common therapies and an effect of kallikrein-kinin inhibitors.

Toxicon **30** : 1257-1279.

Ismail M. 1995. Review article : The scorpion envenoming syndrome. *Toxicon* **33** : 825-858.

Ismail M., Aly M.H.M., Abd Essalem M.A., Morad M.A.1996. A three-compartment open pharmacokinetic model can explain variable toxicities of cobra venoms and their alpha-toxins . *Toxicon* **34** : 1011-1026.

Ismail M, Abd-Elsalam MA. 1998. Pharmacokinetics of ¹²⁵I-labelled IgG, F(ab')₂ and Fab fractions of scorpion and snake antivenins: merits and potential for therapeutic use. *Toxicon* **36(11)**: 1523-8.

Ismail M. 2003. Treatment of the scorpion envenoming syndrome : 12 years experience with serotherapy. *Int J Antimicrob Agents*. **21 (2)** : 170-4

Janway, Travers, Walport, Sholomchk. 2003. *Immunologie. Edition : De Boek et Larcier.* Pp 616-617.

Jurisson S., Lydon J.D. Potential Tc small molecule radiopharmaceuticals. *Chem. Rev.***1999.99.** 2205-2218.

Kearney J.F., Radbuch A., Liesegang B., Rajewsky K. 1979. A new mouse myeloma cell line that has lost immunoglobulin expression but permits the construction of antibody-secreted hybrid cell lines. *J. Immunol.***123.** 1548-1550.

Khazaeli MB, Conry RM, LoBuglio AF. 1994. Human immune response to monoclonal antibodies. *J Immunother.* **15 (1)** : 42-52. Review.

Kipriyanov SM, Moldenhauer G, Braunagel M, Reusch U, Cochlovius B, Le Gall F, Kouprianova OA, Von der Lieth CW, Little M. 2003. Effect of domain order on the activity of bacterially produced bispecific single-chain Fv antibodies. *J Mol Biol.* **330 (1)** : 99-111.

Kohler G. et Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibodies of predefined specificity. *Nature*, **1975, 256**, 495-497.

Kopeyan C., Martinez G., Lissitzky S., Miranda F., et Rochat H. 1974. Disulfide bonds of the toxin Aah II. *Eur. J. Biochem.* **256(5517)**: 495-7.

Kopeyan C., Miranda F., Rochat H. 1975. Amino acid sequence of toxin III of *Naja haje*. *Eur.J.Biochem.***58** :117-122.

Kohler G. et Milstein C. 1976. Derivation of specific antibody-producing tissue culture and tumor lines by cell fusion. *Eur. J.Immunol.***6.** 511-519.

Kopeyan C., Mansuelle P., Martin-Eauclaire M.F., Brando T., Bahraoui E.M., Rochat H., et Granier C. 1990. Primary structure of anti-insect toxins isolated from the venom of *Leiurus quinquestratus quinquestratus*. *FEBS Lett.* **261** : 423-426.

Kopeyan C., Mansuelle P., Martin-Eauclaire M.F., Rochat H and Miranda F. 1993. Characterization of toxin III of the scorpion *Leiurus quinquestratus quinquestratus* : A new type of alpha-toxin highly toxic both mammals and insects. *Nat. Toxins* **1** : 308-312.

Kortt AA, Lah M, Oddie GW, Gruen CL, Burns JE, Pearce LA, Atwell JL, McCoy AJ, Howlett GJ, Metzger DW, Webster RG, Hudson PJ. 1997. Single-chain Fv fragments of anti-neuraminidase antibody NC10 containing five- and ten-residue linkers form dimers and with zero-residue linker a trimer. *Protein Eng.* **10 (4)** : 423-33.

Krifi M., Miled K., Abderrazek M., and El Ayeb M. 2001. Effect of antivenom on *Buthus occitanus tunetanus* scorpion venom pharmacokinetics : Toward an optimisation of antivenom immunotherapy in a rabbit model. *Toxicon* **39** : 1317-1326.

- Krifi M.N., Choumet V., Bon C., El Ayeb M . 2002 a.** Controverse au sujet de l'utilité de l'immunothérapie antiscorpionique : fait et perspectives. *Infotox* **15** : 9-11.
- Krifi M.N., Miled K., Choumet V., Bon C., El Ayeb M. 2002 b.** Immunothérapie antiscorpionique: fait et perspectives. Toxines et recherches biomédicales. *Edition scientifique et médicale Elsevier*, pp 253-256.
- Krifi M.N., Savin S., Debray M., Bon C., El Ayeb M. , Choumet V. 2005.** Pharmacokinetic studies of scorpion venom before and after antivenom immunotherapy. *Toxicon* **45** : 187-198
- Laraba-Djebari F., Legros C., Crest M., Céard B., Romi R., Mansuelle P., Jacquet M., Van Rietschoten J., Gola M., Rochat H., Bougis P., et Martin-Eauclaire MF. 1994.** The kaliotoxin family enlarged : Purification, characterization and Precursor nucleotide sequence of KTX2 from *Androctonus australis hector*. *J.Biol.Chem.* **269**: 32 815-32 843.
- Laraba-Djebari F., et Hammoudi-Triki D. 1998.** Utilisation de la fraction toxique majoritaire isolée à partir du venin dans la valorisation du sérum antiscorpionique. *Archives de l'Institut Pasteur d'Algérie.* **62** : 254-266.
- Le Gal J.** Nouveaux radio pharmaceutiques du ^{99m}Tc : de la conception à l'évaluation biologique. Doctorat Chimie et Radiochimie. 8 Nov 2004. Université Paul Sabatier. Toulouse III.
- Legros C., et Martin-Eauclaire M.F. 1997.** Les toxines de scorpion. *C.R.Soc.Biol.***191** :345-380.
- Litterfield J.W. 1964.** *Science* **145**, 709.
- Lester D., Lazarovici P., Pelhate M, et Zlotkin E. 1982.** Two insect toxins from the venom of scorpion *Buthus judaicus* : Purification, characterization and mode of action. *Biochim.Biophys.Acta* **701** :370-381.
- Liu,S, Edwards S.D.** ^{99m}Tc-labelled small peptides as diagnostic radiopharmaceuticals. *Chem. Rev.***1999.99.**2235.2268.
- Long MC, Marshall KE, Kearney BJ, Ludwig GV, Wong JP, Nagata LP. 2001.** Pharmacokinetics study of a novel chimeric single-chain variable fragment antibody against western equine encephalitis virus. *Hybridoma.* **20 (1)** : 1-10.
- Lydyard P.M., Whelan A. 2002.** *L'essentiel en immunologie. Edition Berti.* pp80, 81.
- Malasit P, Warrell DA, Chanthavanich P, Viravan C, Mongkolsapaya J, Singthong B, Supich C. 1986.** Prediction, prevention, and mechanism of early (anaphylactic) antivenom reactions in victims of snake bites.*Br Med J (Clin Res Ed).* **292 (6512)** : 17-20.
- Mc Conahey P.J., Dixon F.J.** Radio iodination of proteins by the use of chloramine-T methods. *Methods. Enzymol.***1980. 70(A).** 210-213.
- Martin MF., et Rochat H. 1984 b.** Purification of thirteen toxins active on mice from the venom of the North African scorpion *Buthus occitanus tunetanus*. **Toxicon** **22** : 279-91.
- Martin M.F., et Rochat H. 1986.** Large scale purification of toxins from the venom of the scorpion *Androctonus australis hector*. *Toxicon* **24** : 1131-1139.
- Martin M.F., Rocaht H., Marchot P., Bougis P.E. 1987.** Use of high performance liquid chromatography to demonstrate quantitative variation in components of venom from the scorpion *Androctonus australis hector*. *Toxicon* **25** : 569-573.
- Martin Eau-Claire M.F., et Couraud F. 1995.** Scorpion neurotoxins : Effects and mechanisms in Handbook of neurotoxicity. *Chang L.W./Dyer Ed, Publishers NY, Basel, Hong Kong Chap* **22** : 683-716.
- Martin Eau-Claire M.F., legros C., Bougis P.E. Rochat H. 1999.** Les toxines des venins de scorpion. *Ann.Inst.Past.***10 (2)** : 207-222.

- Master RW., Rao SS., Soman PD. 1963.** Electrophoretic separation of biologically active constituents of scorpion venoms. *Biochem Biophys Acta*. **71**: 422-8
- Mather S.J., Ellison D. 1990.** Reduction-mediated technétium-99m labelling monoclonal antibodies. *J.Nucl.Med.* **31**: 692-697.
- Miranda F., Kopeyan C., Rochat H., and Lissitzky S. 1964.** Sur les neurotoxines des deux espèces de scorpions Nord africains. Propriété des neurotoxines (scorpamines) d'*Androctonus amoreuxi*(L) et de *Buthus occitanus* (Am). *Toxicon* 2 : 123-138.
- Miranda F., Kopeyan C., Rochat H., and Lissitzky S. 1970.** Purification of animal neurotoxins. Isolation and characterization of eleven neurotoxins from the venom of the scorpion *Androctonus australis hector*, *Buthus occitanus*, and *Leiurus quinquestriatus*. *Eur. J. biochem.* **16** : 514-523.
- Murugesan S., Rhada Krishna Murthy K., Noronha OPD., et Samuel AM. 1999.** Tc 99m- Scorpion venom: Labelling, Biodistribution and scintimaging. *J.Venom.Anim.Tox.* vol.5 n°1.
- Nowotnick D.P., Verbruggen A.M.** Practical and physiochemical aspects of the preparation of technetium 99m labeled radiopharmaceuticals. *Ln : textbook of radio pharmacy . Theory and practice, 3rd edition. C.B. Sampson. Gordon and Breach Science publishers. 1999.* 33-56.
- Palmer M.** Basics mechanisms of radiolabeling. 1999. *Ln: Textbook of radiopharmacy. Theory and practice, 3rd, ed.C.B. Sampson. Gordon and Breach science Publishers: 530.*
- Patricia J., conahey M.C. & Dixon F.1980.** Radioiodination of proteins by the use of chloramine-T method. *Ed. Academic Press.*
- Pelhate M., et Zlotkin E. 1981.** Voltage dependent slowing of the turn off of Na⁺ current in the cockroach giant axon induced by the scorpion venom « insect toxin ». *J. Physiol. (Lond.)*. **319** : 30-31.
- Pelhate M., et Zlotkin E. 1982.** Action of insect toxins and other toxins derived from the venom of scorpion *Androctonus australis* on isolated giant axons of the cockroach *Periplaneta americana*. *J.Exp.Biol.* **97** : 66-77.
- Pepin-Covatta S., Lutsch C., Grandgeorge M., Lang J., Schermann JM. 1996.** Immunoreactivity and pharmacokinetics of horse antiscorpion venom F(ab')₂ –scorpion venom interactions. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 141 (1): 272-7.
- Pluckthun A, Pack P. 1997.** New protein engineering approaches to multivalent and bispecific antibody fragments. *Immunotechnology.* **3 (2)** : 83-105.
- Pontecorvo G. 1975.** Production of mammalian somatic cell hybrids by means of PEG treatment . *Somatic cell Genet.* **1.** 397-400.
- Possani L.D., Becerill B., Delpierre M., Tytgat J. 1999.** Scorpion toxins specific for sodium channels. *Eur.J.Biochem.***264** : 287-300.
- Potter M. 1972.** Immunoglobulin-producing tumors and myeloma proteins of mice. *Physiol, Rev.* **52.** 631-719.
- Regeczy E.** *In vivo* behavior of catabilized labels derived from iodoproteins. **1987.** *Ln: iodine labelled plasma proteins.. Vol II, Part B, CRC Press: 43-71.*
- Revelo M.P., Bambirra E.A., Ferriera A.P., Diniz C.R., Chavez-Olortegni C. 1996.** Body distribution of *Tityus serralitus* scorpion venom in mice and effects of scorpion antivenom. *Toxicon* **34** : 1119-1125.
- Rheinacker M, Hardt C, Ilag LL, Kufer P, Gruber R, Hoess A, Lupas A, Rottenberger C, Pluckthun A, Pack P. 1996.** Multivalent antibody fragments with high functional affinity for a tumor-associated carbohydrate antigen. *J Immunol.* **157 (7)** : 2989-97.

- Ritter M.A., Ladymen H.M. 1995.** Monoclonal antibodies : Production engineering and clinical applications. *Edition Cambridge University Press.* pp 9-11. **25**
- Robles A.M., Balter H.S., Olovier P., Welling M.M., Pauwels E.K.** Improved radio iodination of biomolecules using exhaustive chloramine-T oxydation. *Nucl.Med.Biol.* **2001.** 28(8). 999-1008.
- Rochat H., Rochat C., Miranda F., Lissitzky S. 1970.** The amino acid sequence of neurotoxin I of *Androctonus australis hector*.*Eur.J.Biochem* **17** : 292-266.
- Rochat H., Rochat C., Sampieri F., Miranda F., Lissitzky S. 1972.** The amino acid sequence of neurotoxin II of *Androctonus australis hector*.*Eur.J.Biochem* **28 (3)** :381-8.
- Rochat H., Bernard P., et Couraud F. 1979.** Scorpion toxins : Chemistry and mode of action. *in adv.Cytopharmacol* **3** : 325-330.
- Rochat H., Rochat C., Kopeyan C., Miranda F., Lissitzky S., Edman P. 1970.** Scorpion neurotoxins : a family of homologous proteins. *FEBS Letters* **10 (5)** : 349-351.
- Rusckowski M., Qu T., Gupta S., Ley A., Hnatowich D.J.** A comparison in monkeys of ^{99m}Tc-labelled to a peptide by four methods. *J. Nucl. Med.* **2001.** 42(12). 1870-1877.
- Santana G.C., Freire A.C.T., Ferreira A.P., Chavez-Olortegni C., Diniz C.R., Freire-Maia L. 1996.** Pharmacokinetic of *Tityus serulatus* scorpion venom determined by enzyme-linked immunosorbent assay in the rate. *Toxicon* **34** : 1063-1066.
- Schwarz A., steinstrasser A. 1987.** A novel approach to Tc-99m-labelled of monoclonal antibodies. *J.Nucl.Med.* **29** : 721.
- Shulman M., Wilde C.D., Kohler G. 1978.** A better cell line for making hybridomas secreting specific antibody. *Nature.* **276.** 269-270.
- Stahli C., Staehelin T., Miggiano Y., Schmidt J. et, Hang P. 1980.** *J.Immunol.Meth.* **32.** 297.
- Taggart R., Samloff. T. et J.M. 1982.** Stable antibody-producing murine hybridomas. *Science.* **219.** 1228-1230.
- Theillaud J.L. 2005.** Les anticorps monoclonaux : de la recherche à l'utilisation thérapeutique.
- Turner DJ, Ritter MA, George AJ. 1997.** Importance of the linker in expression of single-chain Fv antibody fragments : optimisation of peptide sequence using phage display technology. *J Immunol Methods.* **205 (1)** : 43-54
- Todorovska A, Roovers RC, Dolezal O, Kortt AA, Hoogenboom HR, Hudson PJ. 2001.** Design and application of diabodies, triabodies and tetrabodies for cancer targeting. *J Immunol Methods.* **248 (1-2)** : 47-66. Review.
- Volkel T, Korn T, Bach M, Muller R, Kontermann RE. 2001.** Optimized linker sequences for the expression of monomeric and dimeric bispecific single-chain diabodies. *Protein Eng.* : **14 (10)** : 815-23.
- Walther C., Zlotkin E., et Rathmayer W. 1976.** Action of different toxins from the venom of the Moroccan scorpion *Bomardochei*. *Eur.J.Biochem.* **162** : 589-599.
- Wilsson J.D., Braunwald E., Isselbacher K.J., Petersdof R.G., Martin J.B., Fanci A.S., Root R.K. 1993.** *Harrison. Principes de médecine interne. Edition : Médecine et sciences. Flammarion.* **pp81,** 1666.
- Yokota T, Milenic DE, Whitlow M, Schlom J. 1992.** Rapid tumor penetration of a single-chain Fv and comparison with other immunoglobulin forms. *Cancer Res.* **52 (12)** : 3402-8.

Zlotkin E., Fraenkel G., Miranda F., Lissitzky S. 1971 a. Scorpion venom on blowfly *Larvae*- A new method for evaluation of scorpion venoms potency. *Toxicon* **9** : 1-8.

Zlotkin E., Miranda F., Kopeyan C., Lissitzky S. 1971 b. A new toxic protein in the venom of the scorpion *Androctonus australis hector*. *Toxicon* **9** : 9-13.

Zlotkin E., Miranda F., Lissitzky S. 1972. Proteins in scorpion venoms toxic to mammals and insects. *Toxicon* **10 (3)** : 207-9.

Zlotkin E., Kadouni D., Gordon D., Pelhate M., Martin M.F., Rochat H. 1985. An excitatory and a depressant insect toxin from the scorpion venom both direct sodium conductance and possess a common binding site. *Arch.biochem.Biophys.* **24.6** : 877-887.

Zlotkin E., Bougis P.E., Chaird B., Benslimane A., Martin-Eauclaire M.F. 1991. Analysis by high liquid performance chromatography of *Androctonus mauritanicus mauritanicus* (black scorpion) venom . *Toxicon* **29** : 951-960.

ملخص

نظرا لأهمية مسألة التسمم بلدغة العقارب في منطقة البحر المتوسط خاصة في المغرب العربي ثم انجاز العديد من الدراسات العلمية قصد تفهم مسيرة السم في الجسم و هذا لتحسين مفعول و طريقة استعمال التلقيح ضد السموم العقاربية. يمثل *Androctonus australis hector* و *Buthus occitanus tunetanus* (Bot) النوعان العقاربين ذو الخطورة البارزة في الجزائر. إن الدراسة المنجزة تصبو من جهة إلى إنتاج مضادات حيوية وحيدة الشعبة موجهة ضد المكون السام الرئيسي (Bot III) لسم العقرب Bot, ومن الجهة أخرى إلى تفهم التوزيع التوقيتي للمكونتان الرئيسيتان السامتان Aah II و Bot III لسمي العقربين Aah و Bot على الترتيب.

و قد تم اختيار الخلايا المنتجة لثبوتها و لإنتاجها المستمر للمضادات الحيوية الوحيدة الشعبة موجهة ضد Bot III عند الفأر. تم إنتاج هذه المضادات الحيوية إلا أن قدرتهن على الإنتاج تبينت ضعيفة كلما طال مقامهن في الوسط الغذائي. تم التطرق أيضا إلى الدراسة التوزيع التوقيتي لسم العقربين Aah و Bot و كذا مكوناتهما الرئيسيتان و هذا بعد التثبيت الإشعاعي بالمركبات الإشعاعية: اليود ^{125}I و التكنسيوم $^{99\text{m}}\text{Tc}$.

في المرحلة الأولى تم القيام بالتثبيت الإشعاعي للسمان الخمان Aah و Bot بالتكنسيوم $^{99\text{m}}\text{Tc}$ و السمان Aah II و Bot III باليود الإشعاعي ^{125}I متبوع بكل التحاليل اللازمة قصد تقييم و تقدير التثبيت الإشعاعي. في المرحلة الثانية: تم دراسة التوزيع التوقيتي للسمين و مكوناتهما الرئيسيتان .

دعمت النتائج ما تبين خلال الدراسات العلمية المسبقة, فالسمان يتميزان بانتشار و توزيع سريعين انطلاقا من نقطة الحقن نحو مختلف المراكز الدموية و النسيجية متنسبية في الاختلالات الفيزيولوجية و الالتهابية لدى الأشخاص المتسممة بلدغة العقارب بالإضافة إلى طرحهما السريع من الجسم عبر الجهاز البولي. برهنت الدراسات الحالية على كمون اختلاف واضح في التوزيع التوقيتي بين السمين من جهة و مكوناتهما الرئيسيتان من جهة أخرى; فالمكونتان السامتان تتميزان لكونهما أسرع انتشارا ابتداء من نقطة الحقن إلا أنه من الصعب تقديرهما في بعض الأعضاء كالقلب و الرئتان زيادة على مكوئهما المطول في الكليتان, خلافا عن السمين الخامين كما تبينه الصورة السنطيغرافية, و مما يدل على طرحهما المتأخر من الجسم عبر الجهاز البولي.

ABSTRACT

Every year, more than 40 000 people in Mediterranean region suffer from scorpion envenomation. In this study, we tried, in one hand, to produce a monoclonal antibody against the most active toxin (Bot III) of the venom of *Buthus occitanus tunetanus* (Bot), and in the other hand, to study the biodistribution of *Androctonus australis hector* (Aah), and Bot venoms and their potent toxins, respectively Aah II and Bot III.

In the first part of the work, monoclonal antibodies directed against Bot III toxin have been developed in mice by hybridoma technology, and supernatants have been screened by both ELISA and RIA assays. Four hybridoma have been selected for their stability and production of a specific Bot III antibodies; with unfortunately a low secretion capacity. In the second part of this work, the pharmacotoxicological aspect of venoms and toxins have been investigated. It firstly consisted in the study of radio labelling methods (radio iodination, technetium $^{99\text{m}}$ labelling), and secondly, in the study of the biodistribution of venoms and toxins radiolabelled in mice and rats, by both dissection and scintigraphy.

Aah and Bot venoms are known for their fast diffusion from the site of injection and diffusion to a vascular and tissular compartments, leading to metabolic perturbation and tissues damage. That was confirmed and showed in a high plasmatic and tissular accumulation of venoms shortly after injection and in their so fast renal elimination. Pharmacokinetic of venoms are different from those of toxins: first of all Aah II and Bot III toxins disappeared more quickly from plasma, to be, on contrary, hardly detected in heart, and lungs, despite their so rapid distribution to tissues. Then, they have been slowly eliminated by the renal route, and that was showed in a continuance of toxins accumulation in kidneys.